

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

CARACTÉRISATION DE PRT, LA NOUVELLE TOXINE RTX CHEZ *ESCHERICHIA COLI*

Par
Joseph Saoud

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	Albert Descoteaux Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Sébastien Faucher Natural resource sciences McGill University
Directeur de recherche	Charles M. Dozois Institut Armand-Frappier
Codirectrice de recherche	France Daigle Université de Montréal

REMERCIEMENTS

Premièrement, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Charles Dozois, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire afin que je puisse faire ma maîtrise et de m'avoir fournie son expertise afin de guider le projet dans la bonne direction. Je veux aussi étendre ce remerciement à ma codirectrice, France Daigle, pour son support, ses idées, son encadrement et son approche méthodologique.

Deuxièmement, je désire aussi remercier Sébastien Houle, sans qui je serais encore pris au clonage de la toxine. J'apprécie beaucoup ta patience, tes explications claires tant au niveau théorique que pratique et ton sens de l'humour, car ce fut définitivement une motivation et un facteur important à la complétion de ma maîtrise.

Troisièmement, merci aux membres du laboratoire présents et passés pour leur aide et l'amusement, en particulier Gaëlle Porcheron, Amélie Garéneaux et Julie Buron.

Quatrièmement, je remercie les organismes subventionnaires pour leur support financier. Ceci inclut le centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) et les instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour mes bourses d'études et le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour leur subvention à la recherche.

Cinquièmement, je remercie Pierre-André Casgrain, Alain Perks et Olivier Séguin pour leur support à travers ma maîtrise, mais aussi pour les bons moments et les plaisirs qu'on a vécus!

Finalement, un grand merci à mon père pour son support et aide, tant financier que morale, tout au long de mes études. Ma vie d'étudiant était beaucoup plus facile grâce à cet aide et j'en suis bien reconnaissant.

DÉDICACE

To my father and I

*If you take everything I have accomplished in my Master's
and condense it down to about 200 pages, it looks decent!*

RR

RÉSUMÉ

Les toxines RTX (« Repeat in Toxins ») sont produites par une gamme de bactéries Gram négatifs et ces toxines ont une masse moléculaire fluctuante de 30 kDa à plus de 600 kDa, dont les cytotoxines constituent le groupe le plus connu dû principalement à l'activité hémolytique des hémolysines suite à une inoculation, sur gélose sang, des souches les exprimant. Cette grande famille de toxines partage deux caractéristiques communes, soit la présence de répétitions riches en glycine et aspartate et la sécrétion via un système de sécrétion de type 1. Le génome d'une souche d'*Escherichia coli* pathogène aviaire récemment séquencé démontre la présence d'un plasmide codant divers facteurs de virulence et une région unique, généralement absente de ce type de plasmide, codant une toxine RTX putative, parmi d'autres gènes. Le but du projet fut donc la caractérisation globale de cette nouvelle toxine. Les analyses de séquences indiquent que ce système est distinct des autres toxines caractérisées. L'hypothèse était que les quatre gènes *CABD* codant pour le système de la toxine RTX assumeront les rôles classiques des toxines RTX et les macrophages, cellules épithéliales et érythrocytes seront lysés par celle-ci. Le clonage de l'opéron et mutation des gènes individuels suivis d'une précipitation protéique et visualisation sur gel SDS-PAGE furent effectuées, ainsi que des tests d'hémolyses et des infections *in vitro*, sur cellules, et *in vivo*, par infection urinaire murine. La toxine PrtA (Pre-repeat RTX toxin) nécessite le gène *prtC* pour l'activation et les gènes *prtBD* et *tolC* pour la sécrétion. Elle lyse les cellules testées, sauf les érythrocytes aviaires, et un mutant $\Delta prtCABD$ est atténué dans le modèle d'infection urinaire murin. On conclut que PrtA est une nouvelle cytotoxine avec une activité hémolytique et cytotoxique.

ABSTRACT

RTX toxins (Repeats in toxins) are produced by a variety of Gram negative bacteria with a molecular mass varying from 30 kDa to more than 600 kDa, where cytotoxins are the best known group due to their hemolytic activity on blood agar plates inoculated with some strains producing these toxins. Two common characteristics are shared amongst this family, which are the presence of repeats rich in glycine and aspartate and the secretion via a type 1 secretion system. An avian pathogenic *E. coli* strain recently sequenced by our laboratory had a virulence plasmid containing a unique region, normally absent from this type of plasmid, coding a predicted RTX toxin, amongst other genes. Sequence analysis demonstrated that this toxin is distinct from previously characterized RTX toxins. The objective of the project was the global characterization of this novel toxin. We hypothesized that the four genes (CABS) comprising the operon would be required for activity or secretion to lead to toxic activity against cells including macrophages, epithelial cells and erythrocytes. Operon cloning, individual gene inactivation followed by protein precipitation and SDS-PAGE analysis were accomplished before moving on to hemolysis tests as well as *in vitro* cell interactions and *in vivo* infections in a murine urinary tract model. The PrtA (pre-repeat RTX toxin) toxin was shown to require the *prtC* gene product for activation and *prtBD* and *tolC* for secretion. All host cell types tested were lysed by the toxin with the exception of avian erythrocytes, and a $\Delta prtCABD$ mutant was attenuated *in vivo*. We therefore concluded that PrtA is a novel RTX toxin present in certain *E. coli* strains and demonstrates both a hemolytic and cytotoxic activity.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	iii
Dédicace	v
Résumé	vii
Abstract	ix
Table des matières	xi
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xvii
Liste des abréviations et des sigles	xix
Revue de littérature	1
1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.1 La collection ECOR	2
1.2 La classification sérologique	2
1.3 Classification par pathotypes	4
1.3.1 Les InPEC	4
1.3.2 Les ExPEC	7
1.3.2.1 Les NMEC	8
1.3.2.2 Les APEC	9
1.3.2.3 Les UPEC	9
1.4 Les infections aviaires	11
1.4.1 La colibacillose aviaire	11
1.4.2 L'aérosacculite	11
1.4.3 Les infections de la membrane vitelline	12
1.4.4 L'infection de l'oviducte	12
1.4.5 La cellulite aviaire	12
1.4.6 Le syndrome de la tête enflée	13
1.5 Les infections urinaires	13
1.5.1 Les bactériuries asymptomatiques	13
1.5.2 Les ITU symptomatiques avec complications et sans complications	14
2 Les facteurs de virulence	16
2.1 Acquisition des facteurs de virulence	16
2.1.1 Les transferts horizontaux	16
2.1.2 Les îlots de pathogénicité	17
2.1.3 Les séquences d'insertions	18
2.2 Facteurs de virulence des UPEC	19

2.2.1	Les systèmes d'acquisition de fer	19
2.2.1.1	L'entérobactine	19
2.2.1.2	Les salmochélines	21
2.2.1.3	L'aérobactine	21
2.2.1.4	La yersiniabactine	23
2.2.2	Les flagelles	27
2.2.3	Les toxines	28
2.2.3.1	HlyA	28
2.2.3.2	Le facteur nécrosant cytotoxique 1	28
2.2.3.3	Les toxines Sat et Vat	29
2.2.3.4	L'adhésine afimbriaire Iha	31
2.3	Les facteurs de virulences des APEC	31
2.3.1	Les plasmides de virulence (plasmides ColV et autres)	31
2.3.2	Les fimbriae de type 1	32
2.3.3	Les fimbriae P	32
2.3.4	Les fimbriae curli	33
2.3.5	L'aérobactine	33
2.3.6	L'antigène capsulaire K	33
2.3.7	L'hémagglutinine thermosensible Tsh	34
2.3.8	L'autotransporteur Vat	35
2.3.9	La survie et la résistance aux macrophages	35
3	Les toxines RTX	36
3.1	Les « hémolysines » RTX	45
3.1.1	HlyA	45
3.1.2	EhxA	47
3.1.3	Les toxines Rtx de la famille Pasteurellaceae	51
3.1.3.1	Apx	52
3.1.3.2	Lkt	53
3.1.3.3	MmxA et MbxA	53
3.2	Les « leucotoxines »	54
3.2.1	LktA et LtxA	54
3.2.2	La toxine CyaA de <i>Bordetella pertussis</i>	55
3.3	Régulation	56
3.4	Les toxines MARTX	58
3.5	Les RTX à domaine cadhérine	61
3.6	Les protéases RTX	61
3.7	Lipases RTX	64

3.8	Bactériocines.....	66
3.9	Protéines RTX de la couche S (« S-layer »).....	66
3.10	RTX chez les cyanobactéries.....	68
3.11	Nodulation.....	69
4	Système de sécrétion de type 1.....	70
4.1	Transporteurs ABC.....	72
4.2	ToIC.....	73
4.3	Assemblage.....	74
5	Formation de pores.....	75
5.1	Formation de pores récepteur-indépendant.....	75
5.2	Formation de pores récepteur-dépendant.....	75
5.3	Formation de pore par l'association de la toxine avec des vésicules de la membrane externe.....	76
6	Oligomérisation.....	78
7	Effet cytotoxique.....	80
	Problématique.....	85
	Matériels et méthodes.....	88
8.1	Similarité des protéines.....	90
8.2	Clonage avec vecteur-T.....	90
8.3	Obtention des mutants.....	92
8.3.1	Mutants des gènes individuels de l'opéron <i>prtCABD</i>	92
8.3.2	Mutation de l'opéron <i>prtCABD</i>	93
8.3.3	Complémentation de la souche Δ <i>prtCABD</i>	93
8.3.4	Fusion promoteur <i>prt</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i>	94
8.4	Précipitation au TCA et migration sur gel.....	94
8.4.1	Surnageant.....	94
8.4.2	Culot.....	95
8.5	Test d'hémolyse sur gélose sang.....	95
8.6	Test d'hémolyse en liquide.....	95
8.7	Infection des cellules hôtes <i>in vitro</i>	96
8.8	Infection urinaire chez la souris.....	98
8.9	Régulation.....	99
8.9.1	Régulation par HN-S.....	99
8.9.2	Expression du système par la fusion lux.....	99
	Résultats.....	100
9.1	Phylogénie.....	100
9.2	Visualisation sur gel et séquençage.....	108
9.3	Hémolyse sur gélose sang.....	111

9.4	Hémolyse en sang liquide	113
9.4.1	Sang humain	114
9.4.2	Sang aviaire	115
9.5	Infection de cellules hôtes <i>in vitro</i>	117
9.5.1	Fibroblastes aviaires et surnageant	117
9.5.2	Interactions bactéries-cellules	118
9.5.2.1	Fibroblastes aviaires	119
9.5.2.2	Macrophages	120
9.5.2.3	Cellules urothéliales	122
9.5.2.4	Cellules rénales	123
9.6	Infection du tractus urinaire chez la souris	124
9.6.1	Coinfection du tractus urinaire chez la souris entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$	124
9.6.2	Coinfection du tractus urinaire chez la souris entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complémentée avec le système <i>prtCABD</i>	125
9.6.3	Monoinfection du tractus urinaire de la souris	126
9.7	Régulation	127
9.7.1	H-NS	127
9.7.2	Fusion du promoteur <i>prt</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i>	129
	Discussion	131
10.1	Comparaisons phylogénétiques des protéines RTX	131
10.2	Visualisation sur gel et séquençage protéique	133
10.3	Hémolyse sur gélose sang et effets des mutants	134
10.4	Hémolyse en liquide	135
10.5	Infections <i>in vitro</i>	136
10.6	Infection <i>in vivo</i>	137
10.7	Régulation	138
	Conclusion	140
	Bibliographie	142

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma pathogénique des <i>Escherichia coli</i> de la famille des InPEC	7
Figure 2 : Les différentes étapes d'une infection du tractus urinaire.	15
Figure 3 : Structure chimique des sidérophores synthétisés par certaines souches d' <i>E. coli</i> pathogènes	24
Figure 4 : Schéma de l'export d'une protéine par le système de sécrétion de type 1	39
Figure 5 : Arrangement génétique des gènes du locus <i>rtx</i>	39
Figure 6 : Résumé des différents domaines de la toxine RTX HlyA et de leurs fonctions	46
Figure 7 : Sécrétion et association de EhxA (EHEC-HlyA) avec les OMV.	50
Figure 8 : Endocytose de la toxine EhxA et l'induction de l'apoptose par celle-ci.....	51
Figure 9 : Organisation génétique de l'opéron <i>rtxCABD</i> ainsi que le site de liaison de RfaH,	57
Figure 10 : Organisation génétique des protéases de la famille des protéines RTX	62
Figure 11 : Arrangement génétique des lipases RTX.....	65
Figure 12 : Activation des SREBP suite à l'efflux de K ⁺	83
Figure 13 : Le plasmide ColV pEC598 d'une taille de 218 kbp provenant de la souche QT598 séquencée par notre laboratoire.....	85
Figure 14 : Région unique retrouvée sur le plasmide ColV pEC598 encodant un fimbriae, un autotransporteur et une toxine RTX.....	86
Figure 15: Organisation génomique du vecteur linéaire pUCm-T vide où le site de multiclonages est localisé dans le gène <i>lacZ</i>	91
Figure 16 : Sélection des colonies suite au clonage d'un fragment d'ADN dans le vecteur pUCm-T.....	92
Figure 17 : Courbe de croissance utilisée lors des infections <i>in vitro</i>	97
Figure 18 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtC	102
Figure 19 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtA	104
Figure 20 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtB	106
Figure 21 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtD.....	107
Figure 22 : Visualisation de la protéine PrtA sur gel SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie suite à une précipitation au TCA.....	108
Figure 23 : Peptides obtenus lors du séquençage protéique de la bande obtenue suite à la précipitation au TCA d'un surnageant de la culture de la souche DH5- α contenant le plasmide pIJ479.	109
Figure 24 : Gel de polyacrylamide des surnageants et/ou culots (lysats de cellules entières de bactéries) des différents mutants manquant un des gènes <i>prt</i>	110
Figure 25 : Hémolyse sur gélose sang de moutons	112
Figure 26 : Hémolyse sur gélose sang humain de la souche d' <i>E. coli</i> K-12 contenant le plasmide pIJ479, des mutants manquant un des gènes <i>prt</i> et de la souche Δ <i>tolC</i> avec pIJ479.....	113
Figure 27: Graphique de la lyse des érythrocytes humains du groupe A et du groupe O après 1 heure d'incubation à 37°C.	114
Figure 28: Graphique de la lyse des érythrocytes humains après une incubation de 4 heures à 37°C...	115

Figure 29: Graphique de la lyse des érythrocytes aviaires.....	116
Figure 30 : Interaction entre les fibroblastes aviaires et des surnageants pendant une durée de 3 heures.	118
Figure 31 : Infections pendant 3 heures des fibroblastes aviaires en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1	119
Figure 32 : Infections pendant 3 heures des fibroblastes aviaires avec la souche QT598 WT.....	120
Figure 33 : Infections pendant 3 heures des macrophages humains THP1 en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1	121
Figure 34 : Infections pendant 4 heures des cellules urothéliales en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1	122
Figure 35 : Infection pendant 4h des cellules rénales humaines en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1	123
Figure 36 : Graphique des infections du modèle urinaire murin entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ où un décompte bactérien fut effectué dans la vessie et les deux reins.	124
Figure 38 : Graphique de l'infection du tractus urinaire murin avec les souches d' <i>E. coli</i> QT598 sauvage et QT598 $\Delta prtCABD$ lui manquant les quatre gènes <i>prtCABD</i> où un décompte bactérien fut effectué dans la vessie et les deux reins.	126
Figure 39 : Hémolyse sur gélose sang d'humains par la souche d' <i>E. coli</i> K-12 BW25113 sauvage et la souche BW25113 Δhns lui manquant la protéine H-NS.....	128
Figure 40 : Luminescence captée pendant 24 heures à 30°C, 37°C et 42 °C lors de l'incubation de la souche QT598 sauvage ayant le promoteur <i>prt</i> fusionné avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans du milieu LB, LB avec fer et LB avec un chélateur de fer.	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différents membres de la famille RTX	37
Tableau 2 : Différentes bactériocines de la famille RTX.....	66
Tableau 5 : Identité de la protéine PrtC avec d'autres protéines RTX par BLASTp.....	100
Tableau 6 : Identité de la protéine PrtA avec d'autres protéines RTX par BLASTp.....	102
Tableau 7 : Identité de la protéine PrtB avec d'autres protéines RTX par BLASTp.....	105
Tableau 8 : Identité de la protéine PrtD avec d'autres protéines RTX par BLASTp.....	106

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

A/E : « Attachante et Effaçante »
ABC : « ATP Binding Cassette »
APEC : *Escherichia coli* Pathogène Aviaire
BAS : Bactériurie Asymptomatique
BHE : Barrière Hématoencéphalique
CBI : Communauté Bactérienne Intracellulaire
CNF1 : Facteur Nécrosant Cytotoxique 1
DAEC : *Escherichia coli* à Adhérence Diffuse
DAP : Acide diaminopimélique
EAEC : *Escherichia coli* EntéroAggrégative
ECOR : « *Escherichia coli* reference collection »,
EHEC : *Escherichia coli* EntéroHémorragique
EIEC : *Escherichia coli* EntéroInvasive
EPEC : *Escherichia coli* EntéroPathogène
ETEC : *Escherichia coli* EntéroToxigénique
ExPEC : *Escherichia coli* Pathogène Extra-intestinal
HUS : Syndrome Hémorragique Urémique
Inh : Inhibiteur de protéases
InPEC : *Escherichia coli* Pathogène Intestinal
IPA : Ilots de Pathogénicité
IS : « Insertion Sequence »
ITU : Infection du Tractus Urinaire
LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Enterotoxine thermolabile
MARTX : « Multifunctional Autoprocessing RTX toxins »
MLEE : « MultiLocus Enzyme Electrophoresis »
MOI : « Multiplicity of Infection »
MRHA : hémagglutinines de type mannose-résistant
MSHA : hémagglutinines mannose-sensible
NMEC : *Escherichia coli* de la Méningite Néonatale
OMV : Vésicule de la membrane externe
O/N : « Over night »
PAI-II_{CFT073} : îlot de pathogénicité II chromosomique de CFT073
PCR : « Polymerase Chain Reaction »
PPEC : *Escherichia coli* Pathogène Porcin
RTX : « Repeats in Toxins »
Sat : « Secreted Autotransporter Toxin »
SPATE : Sérine Protéase Autotransporteur des Enterobacteriaceae
SREBP : « Sterol Regulatory Element Binding Protein »
SST1 : Système de sécrétion de type 1
ST : Enterotoxine thermostable
STEC : *Escherichia coli* avec Shiga Toxines
TCA : Acide trichloroacétique

UPEC : *Escherichia coli* Pathogène Urinaire
Vat : « Vacuolating Autotransporter Toxin »

Unités de mesure

Da : Dalton

Kb : Kilobase

Kd : Constante de dissociation

kDa : KiloDalton

M : Molaire

mM : Milli molaire

nm : Nanomètre

pb : Paires de bases

RCF: « Relative centrifugal force »

UFC : « Colony-forming unit »

µg : microgramme

µL : microlitre

µm : micromètre

REVUE DE LITTÉRATURE

1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, un bacille Gram négatif à flagelles péritriches faisant partie de la famille *Enterobacteriaceae*, est la bactérie anaérobie facultative majoritaire isolée en culture de la flore intestinale humaine, et dont la plupart des souches sont non pathogènes ([Kaper et al., 2004](#)). La relation symbiotique existante entre la microflore du tractus digestif humain, composée majoritairement de bactéries anaérobies strictes et quelques bactéries anaérobies facultatives, et l'humain aide à maintenir l'homéostasie et la santé de l'hôte. Le tractus gastro-intestinal des nouveau-nés est colonisé par des souches d'*E. coli* commensales dans les heures suivants la naissance ([Kaper et al., 2004](#)). Toutefois, diverses infections et septicémies sont causées par certaines souches pathogènes.

Les souches pathogènes sont différentes des souches non pathogènes par l'acquisition de différents facteurs de virulence permettant une adaptation à une nouvelle niche écologique ainsi que la possibilité de causer une infection. Les *E. coli* pathogènes peuvent être divisées en deux groupes, les pathogènes intestinaux (InPEC) causant des infections intestinales et les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) pouvant infecter plusieurs organes. La taille du génome des souches pathogènes est plus grande, notamment à cause de la présence des gènes de virulence ([Welch et al., 2002](#)). Par exemple, la souche d'*E. coli* pathogène urinaire (UPEC – Urinary tract pathogenic *E. coli*) CFT073 a un génome de 5.2 Mpb, comparé à 4.6 Mpb pour *E. coli* K-12 non pathogène, où 74% du génome est identique, ce qui revient à 3189 gènes ou ORF sur 4288 ([Blattner et al., 1997](#); [Welch et al., 2002](#)). Une différence du génome existe aussi entre des souches appartenant au même groupe, tel que les souches UPEC CFT073 et 536 ([Marrs et al., 2005](#)).

1.1 La collection ECOR

La collection ECOR, pour « *Escherichia coli* reference collection », est un modèle phylogénétique dont le but est de relier des souches d'*E. coli* commensales et pathogènes à un ancêtre commun ([Ochman et Selander, 1984](#)). Ochman et Selander, en 1984, prirent des prélèvements à partir de fèces d'humains et d'animaux sains ou affectés d'une infection urinaire, et provenant de différentes régions géographiques, afin d'obtenir une représentation de la diversité d'*E. coli* suite à des analyses génétiques et phénotypiques ([Ochman et Selander, 1984](#)). Une analyse enzymatique des gènes métaboliques conservés par la méthode « multilocus enzyme electrophoresis » (MLEE), utilisant 38 enzymes, regroupe les 72 souches observées en cinq groupes, soit A, B1, B2, D et E, où les groupes A et B1 sont les plus proches phylogénétiquement ([Ochman et Selander, 1984](#)). La majorité des souches commensales humaines sont classées dans le groupe A, tandis que les souches provenant de mammifères non-primates sont classées dans le groupe B1 ([Duriez et al., 2001](#)). Les souches pathogènes se retrouvent surtout dans les groupes B2 et D, où les souches ExPEC composent la majorité du groupe B2 ([Johnson et Russo, 2002](#); [Russo et al., 2002](#)). Étant donné que les groupes B2 et D contiennent des souches pathogènes, ces groupes contiennent donc les souches avec les plus gros génomes ([Johnson et Russo, 2002](#); [Russo et al., 2002](#)). Le groupe E contient les souches qui restent à être catégorisées.

1.2 La classification sérologique

La classification sérologique, établie par Kauffmann en 1947, est basée sur les antigènes O, H et/ou K se retrouvant à la surface bactérienne ([Moblely et al., 2009](#)). L'antigène O, pour « Ohne Hauch », correspond à la chaîne latérale O composant les lipopolysaccharides (LPS), l'antigène H, pour « Hauch » correspond à une protéine du flagelle, et l'antigène K, pour « Kapsel », correspond au polysaccharide de la capsule bactérienne ([Moblely et al., 2009](#); [Poolman et Wacker, 2015](#)). Jusqu'à maintenant, plus de 180 antigènes O, 56 antigènes H et 80 antigènes K ont été identifiés ([Moblely et al., 2009](#); [Poolman et Wacker, 2015](#)).

Le LPS contient trois parties, soit le lipide A permettant l'ancrage à la membrane externe, un noyau d'oligosaccharide phosphorylé non répétitif, et la chaîne latérale O constituant l'antigène O, un polymère de glycanes composant la région variable du LPS, où la variabilité est fonction de la composition du sucre, des liaisons entre les sucres, et la présence de substitutions par des résidus non glucidiques ([Whitfield et Roberts, 1999](#); [Mobley et al., 2009](#)). Un test d'agglutination effectué en incubant des bactéries avec un antisérum de lapin préalablement immunisé avec des antigènes O connus permet de distinguer les différents sérogroupes. Le test d'agglutination possède plusieurs inconvénients, tels que des réactions croisées entre les antigènes O d'*E. coli* et ceux des genres *Shigella*, *Salmonella*, et *Klebsiella*, une nécessité de beaucoup d'antisérum avec la découverte croissante des antigènes O, et finalement des faux négatifs causés par la présence d'une capsule capable d'empêcher la reconnaissance de l'antigène O ([Nataro et Kaper, 1998](#); [Whitfield et Roberts, 1999](#)). Les souches formant des colonies lisses sur géloses expriment l'antigène O, tandis que celles ayant une morphologie coloniale rugueuse n'expriment pas l'antigène O et ne peuvent être sérotypées pour cet antigène ([Poolman et Wacker, 2015](#)).

L'antigène H correspond à la flagelline, composante de la flagelle, structure responsable de la motilité bactérienne ([Schoenhals et Whitfield, 1993](#)). Les trois éléments d'un flagelle sont le corps basal servant d'ancrer le flagelle à la bactérie, le crochet permettant le transfert du mouvement et le filament flagellaire composés de polymères de flagelline ([Schoenhals et Whitfield, 1993](#)). Un test d'agglutination avec un antisérum, similaire à celui pour l'antigène O, est utilisé pour des fins de classification, et rencontre un problème commun, soit les réactions croisées entre les antigènes H d'*E. coli* ([Schoenhals et Whitfield, 1993](#)).

L'antigène K est un polysaccharide acide composant la capsule bactérienne, qui elle est absente de plusieurs souches puisqu'elle n'est pas une composante vitale ([Whitfield, 2009](#)). Les souches possédant une capsule sont organisées en quatre groupes selon l'organisation génétique et la régulation des gènes codant la capsule ([Whitfield, 2009](#)).

Il existe aussi l'antigène F des fimbriaes responsables de l'adhérence des bactéries aux cellules cibles ([Thanassi et al., 2007](#)). Un seul fimbria correspond à plusieurs groupes sérologiques, tel le cas avec les fimbriae P dont plus de 12 groupes sérologiques furent établis, et l'inclusion de ce quatrième antigène permettrait une différenciation accrue entre les sérogroupes déterminés par les antigènes O et H ([Thanassi et al., 2007](#)).

1.3 Classification par pathotypes

La classification par pathotypes est basée sur le tropisme cellulaire, l'hôte infecté ainsi que le mode d'infection et se divise en deux familles, les souches causant des infections intestinales, les InPEC, et les souches causant des infections extra-intestinales, les ExPEC ([Kaper et al., 2004](#)). Puisque cette classification est fondée sur le type de pathologies, les souches non pathogènes sont exclues de cette classification ([Kaper et al., 2004](#)).

1.3.1 Les InPEC

Les souches de cette famille sont toutes responsables de diarrhées, mais elles diffèrent par leurs mécanismes de colonisation, les facteurs de virulence employés et les symptômes qui peuvent être caractéristiques d'un groupe. Ce sont ces différences qui permettent de diviser cette famille. La [figure 1](#) résume ces différences.

Les souches d'*E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) causent une diarrhée aqueuse persistante, d'une durée d'aussi longue que 120 jours, affectant notamment les jeunes enfants, et parfois les adultes, dans les pays développés suite à une contamination oro-fécale ([Nataro et Kaper, 1998](#); [Farthing, 2004](#)). Ces souches sont aussi présentes dans les pays en voie de développement, où les infections peuvent être mortelles ([Nataro et Kaper, 1998](#); [Farthing, 2004](#)). Des lésions attachantes effaçantes (A/E) permettant aux bactéries de lier intimement les cellules épithéliales intestinales, réassembler le cytosquelette et détruire les microvillosités tout en formant des structures en piédestal sont un trait qui distingue les EPEC des souches commensales et de la plupart des

souches pathogènes ([Nataro et Kaper, 1998](#); [Farthing, 2004](#)). Le locus d'effacement des entérocytes (LEE-locus of enterocyte effacement) code pour les protéines nécessaires à la médiation des lésions A/E ([Kaper et al., 2004](#)).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de diarrhées hémorragiques aqueuses (dysenteries) et du syndrome hémolytique urémique (SHU) qui se développe chez certains patients ([Karmali et al., 1983](#); [Nataro et Kaper, 1998](#)). Le réservoir naturel des EHEC est le tube digestif des bovins, d'où l'association des EHEC avec la viande mal cuite, en particulier le bœuf haché, donnant ainsi l'appellation « la maladie du hamburger » ([Karmali et al., 1983](#); [Nataro et Kaper, 1998](#)). Les facteurs de virulence des EHEC sont le LEE, aussi retrouvé chez les EPEC, et la toxine Shiga, responsable des hémorragies accompagnant la diarrhée et du SHU ([Karmali et al., 1983](#); [Nataro et Kaper, 1998](#)). Les EHEC sont un sous-groupe des *E. coli* Shiga toxigénique (STEC) qui eux produisent des toxines Shiga, mais n'encodent pas le LEE ([Kaper et al., 2004](#)).

Les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) sont principalement présentes dans les pays en voie de développement et sont responsables de la diarrhée du voyageur suite à une contamination oro-fécale qui mènera à une diarrhée aqueuse en seulement 14 à 50 heures post-contamination ([Nataro et Kaper, 1998](#); [Taxt et al., 2010](#)). Suite à la colonisation du petit intestin, il y a production d'une entérotoxine thermolabile (LT) et d'une entérotoxine thermostable (ST), deux facteurs de virulence responsables des diarrhées ([Kaper et al., 2004](#)).

Les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) infectent particulièrement les enfants, et ce dans les pays développés et en voie de développement, chez qui elles amènent des diarrhées persistantes aqueuses ([Hicks et al., 1996](#)). La production de cytotoxines et d'entérotoxines autres que LT et ST des ETEC causent une augmentation de la sécrétion de mucus. Ceci permet la formation de biofilms, aspect les différenciant des EPEC, qui eux forment des microcolonies à la surface des cellules cibles ([Kaper et al., 2004](#)).

Les souches entéroinvasives (EIEC) provoquent généralement des diarrhées aqueuses et mucoïdes, et parfois des dysenteries semblables à celles produites par les

EPEC, et les membres de ce groupe sont capables d'envahir leurs cellules cibles ([Kaper et al., 2004](#)). Les EIEC sont présents majoritairement dans les pays en voie de développement où la transmission se fait par la consommation de nourriture ou eau contaminée ([Kaper et al., 2004](#)). L'infection par les EIEC se fait en trois étapes. Premièrement, il y a une invasion des cellules épithéliales de l'hôte suivie par la division intracellulaire des bactéries, et finalement propagation aux cellules adjacentes par le biais du réarrangement du réseau d'actines des cellules épithéliales ([Kaper et al., 2004](#)).

Les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) infectent habituellement les enfants moins de cinq ans et elles sont responsables d'une diarrhée aqueuse avec absence de sang et de leucocytes ([Kaper et al., 2004](#)). La production d'effecteurs cytopathogènes fimbriaires déclenche le développement d'excroissance des microvillosités permettant l'adhérence diffuse aux cellules cibles et ainsi les différenciant des EPEC, le groupe dans lequel elles étaient auparavant classées ([Kaper et al., 2004](#)).

Les *E. coli* adhérentes invasives (AIEC) envahissent et se répliquent dans les cellules des plaques de Peyer composant le tissu lymphoïde intestinal via la production de LPS et de fimbriae de type 1 par un mécanisme identique aux EIEC ([Darfeuille-Michaud, 2002](#); [Simpson et al., 2006](#); [Strober, 2011](#)). Les AIEC peuvent survivre dans les macrophages sans induire l'apoptose, la nécrose ou un changement, et en permettant aux macrophages de rester actifs, ce qui est un trait propre aux AIEC ([Darfeuille-Michaud, 2002](#); [Simpson et al., 2006](#); [Strober, 2011](#)). Les AIEC sont associées avec la maladie de Crohn et avec les diarrhées canines ([Darfeuille-Michaud, 2002](#); [Simpson et al., 2006](#); [Strober, 2011](#)).

Une épidémie d'*E. coli* associée à des germes contaminés en Allemagne était causée par une souche du sérotype O104:H4, un hybride entre EHEC et EAEC puisque la bactérie est responsable de dysenteries et du SHU tout en démontrant une liaison en agrégats aux cellules de l'hôte. Ceci démontre la plasticité du génome d'*E. coli* et la possibilité d'émergence de nouveaux pathotypes, comme dans ce cas-ci, où le transfert horizontal génétique, en particulier les gènes codant des facteurs de virulence, en est la cause ([Frank et al., 2011](#); [Scheutz et al., 2011](#)).

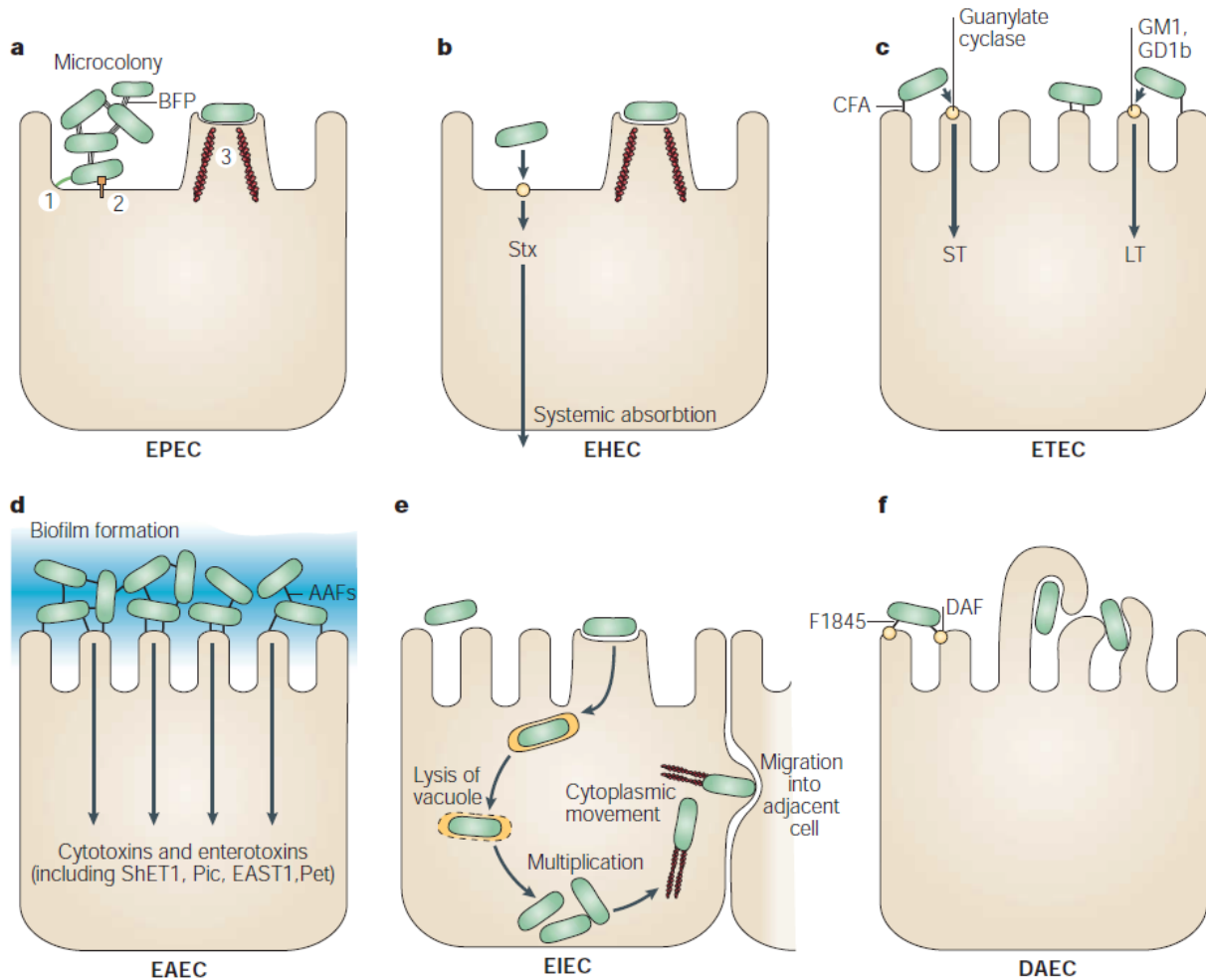


Figure 1 : Schéma pathogénique des *Escherichia coli* de la famille des InPEC (Kaper et al., 2004)

Ce schéma démontre les diverses interactions qui ont lieu entre les pathotypes de la famille InPEC et leurs cellules cibles. a) Les EPEC forment des microcolonies permettant leur adhésion aux cellules, détruisent les microvillosités caractéristiques des liaisons attachantes/effaçantes et forment un piédestal par le réarrangement du cytosquelette. Il y a : 1. Adhésion initiale, 2. Translocation de protéines par le système de sécrétion de type 3, 3. Formation du piédestal. b) Les EHEC produisent une toxine Shiga en plus de la destruction des microvillosités pour les liaisons attachantes/effaçantes dans le colon et la formation d'un piédestal. c) Les ETEC produisent une entérotoxine thermolabile (LT) et une entérotoxine thermostable (LS) responsables de diarrhées. d) Les EAEC produisent des entérotoxines et des cytotoxines tout en formant un biofilm à la surface. e) Les EIEC lysent la vacuole qui permet l'envahissement des cellules de l'hôte pour ensuite se multiplier et envahir les cellules adjacentes. f) Les DAEC induisent le développement d'une excroissance les entourant. (Kaper et al., 2004)

1.3.2 Les ExPEC

Les pathogènes extra-intestinaux, contrairement aux pathogènes intestinaux, font partie de la microflore intestinale humaine sans causer de maladie, mais lorsqu'ils

se retrouvent dans un autre environnement, le développement d'une infection pouvant avoir une morbidité et une mortalité élevées peut avoir lieu ([Russo et Johnson, 2000](#); [Russo et Johnson, 2003](#); [Alteri et Mobley, 2012](#)). Le génome des ExPEC code pour des facteurs de virulence permettant de les différencier des *E. coli* exclusivement commensales et des InPEC ([Russo et Johnson, 2000](#); [Russo et Johnson, 2003](#); [Alteri et Mobley, 2012](#)). L'émergence globale d'*E. coli* multirésistant de séquence type (ST) O25b :ST131 représente un défi majeur contre la prévention et la gestion des infections causées par *E. coli* et il n'existe aucun vaccin prophylactique contre les ExPEC ([Poolman et Wacker, 2015](#)). Aux États-Unis, le nombre de cas d'ExPEC ayant un spectre étendu de résistance aux β -lactames a augmenté de 300%, menant à un échec du traitement, une augmentation du taux d'hospitalisation, de la morbidité et mortalité, ainsi que des coûts associés au système de santé ([Poolman et Wacker, 2015](#)).

1.3.2.1 Les NMEC

Les ExPEC et les streptocoques du groupe B sont les principaux agents causant des méningites néonatales ([Poolman et Wacker, 2015](#)). Le taux de mortalité des infections à *E. coli* causant la méningite néonatale (NMEC) peut atteindre 40% et les nouveau-nés survivants sont, dans la moitié des cas, atteints de séquelles neurologiques tels que des convulsions, paralysies et des hydrocéphalies ([Unhanand et al., 1993](#); [Sik Kim, 2006](#)). Les NMEC proviennent de la flore commensale ou de l'environnement et elles colonisent le tractus intestinal du nouveau-né avant d'atteindre le système circulatoire sanguin par une translocation à travers la paroi ([Glode et al., 1977](#); [Sussman, 1997](#); [Bonacorsi et Bingen, 2005](#)). L'atteinte du système nerveux central (SNC) requiert le passage de la barrière hématoencéphalique (BHE), ce que les bactéries accomplissent via une translocation dans une vacuole fermée qui ne cause pas de perturbation du BHE et dans laquelle il n'y a pas de réplication cellulaire ([Xie et al., 2004](#)). Des fimbriae et des facteurs afimbriaires médient l'adhérence aux cellules du BHE, induisant la production de pseudo-microvillosités facilitant la translocation ([Xie et al., 2004](#)). Une capsule ainsi que des protéines de la membrane externe confèrent une résistance au sérum et permettent le transport dans la cellule cible ([Kaper et al., 2004](#)).

Dans un fort 80% des cas, c'est le sérotype K1 qui est associé aux méningites néonatales combiné avec quelques sérotypes O ([Xie et al., 2004](#); [May et al., 2005](#)).

1.3.2.2 Les APEC

Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables d'une mortalité allant jusqu'à 20% chez les poulets infectés et diminuent leurs croissances, réduisant la valeur sur le marché et augmentant le taux de refus aux abattoirs ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Les souches APEC font partie de la flore intestinale de la volaille, mais lorsque ces animaux respirent des particules fécales contaminées par les APEC, ils développent des infections tels que les péritonites, les omphalites, le syndrome de la tête enflée, la cellulite, l'aérosacculite et la septicémie ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Le risque d'infections et/ou l'accentuation de la maladie augmentent avec les stress environnementaux auxquels les animaux sont exposés ainsi qu'une infection déjà en place par *Mycoplasma gallisepticum* ou par une infection virale ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Les facteurs de virulence utilisés par les APEC sont les fimbriae, nécessaires aux premières étapes de l'infection, les sidérophores et les toxines ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Les sérotypes isolés le plus souvent sont O1, O2 et O78 et ce dernier est aussi présent fréquemment chez les ETEC affectant les humains et les O78 des APEC et ETEC sont rapprochés phylogénétiquement, mais diffèrent dans leur arsenal de facteurs de virulence ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Les animaux seraient potentiellement un réservoir des souches ETEC infectant les humains, sans mentionner l'existence d'un risque de zoonose des souches APEC, mais aussi des souches porcines (PPEC) qui finiront par causer des infections du système respiratoire ou des infections du tractus urinaire ([Chanteloup et al., 2011](#)). Les souches APEC sont responsables d'importantes pertes économiques dans l'industrie alimentaire ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#); [Ghunaim et al., 2014](#)).

1.3.2.3 Les UPEC

Les infections du tractus urinaires (ITU) peuvent être le résultat d'une infection par *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas*

aeruginosa ([Russo et Johnson, 2003](#)). Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) causent près de 80% des infections du tractus urinaire ([Russo et Johnson, 2003](#)). Les souches UPEC sont membres de la flore intestinale colonisant le colon sans générer de maladie ([Russo et Johnson, 2003](#)). Une différence anatomique rend les femmes plus susceptibles aux ITU, et 40% des femmes contracteront une ITU, contrairement à 12% des hommes ([Russo et Johnson, 2003](#)). De plus, jusqu'à 30% des femmes subiront des infections urinaires récurrentes ([Marrs et al., 2005](#)). Une distance plus petite entre l'anus et la région périurétrale et une précolonisation du vagin par les UPEC le transformant en réservoir potentiel rend les femmes plus susceptibles aux ITU, sans mentionner un urètre plus grand chez l'homme, ce qui augmente la distance pour atteindre la vessie et augmente les chances d'éliminer les bactéries lors de l'urination ([Xie et al., 2006](#)). L'emploi de la contraception, telle que le condom, le diaphragme et les spermicides, les antibiotiques et les activités sexuelles augmentent les risques de contraction d'une ITU ([Xie et al., 2006](#)). Jusqu'à six mois suivant la première ITU, une femme a trois fois plus de risque de contracter une deuxième ITU comparé à une femme n'ayant jamais eu une infection urinaire, car la souche peut toujours rester présente dans la flore intestinale ou vaginale ([Xie et al., 2006](#)). Le taux de récurrence varie selon l'âge de la personne, l'activité sexuelle et l'utilisation de la contraception ([Ikaheimo et al., 1996](#)). Il existe plusieurs facteurs responsables d'une prédisposition à une ITU. Les hormones ont un rôle, car l'œstrogène diminue le pH vaginal ce qui offre une meilleure protection contre une infection ([Foxman, 2002](#)). Les femmes fécondes et les femmes dans leur cycle menstruel sont moins susceptibles aux ITU puisque la concentration d'œstrogène est plus élevée ([Foxman, 2002](#)). Les femmes prépubères et ménopausées sont donc plus à risque puisque la concentration d'œstrogène produite est plus faible, au point où des crèmes d'estrogène sont utilisées chez les femmes ménopausées pour réduire le risque d'une ITU, surtout lorsque celles-ci subissent des infections récurrentes ([Hooton et al., 1996](#); [Foxman, 2002](#)). Il a été démontré qu'en présence d'estrogène, l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales est réduite ([Hooton et al., 1996](#)). La présence d'un corps étranger tel un cathéter, une anomalie du tractus urinaire ou défaillance des reins augmente les risques d'acquérir une ITU ([Hooton et al., 1996](#); [Foxman, 2002](#)). Les infections du tractus urinaire associées à un

cathéter sont le deuxième type d'infection nosocomiale la plus fréquente aux États-Unis ([Sievert et al., 2013](#)). Les personnes souffrant de diabète ou ayant un système immunitaire affaibli sont aussi plus à risque ([Foxman, 2002](#)).

1.4 Les infections aviaires

Les souches APEC causent plusieurs maladies, notamment la colibacillose aviaire, l'aérosacculite, les infections de la membrane vitelline, les infections de l'oviducte, la cellulite aviaire et le syndrome de la tête enflée. Ces différentes maladies seront discutées brièvement.

1.4.1 La colibacillose aviaire

La colibacillose aviaire, aussi appelée une colisepticémie, affecte les poulets, les dindes et les canards âgés entre quatre et douze semaines et elle est caractérisée par une péricardite, une périhépatite, une aérosacculite, une synovite, une péritonite, une conjonctivite et une entérite ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). La détection de lésions macroscopique associée avec une aérosacculite, une péricardite ou une périhépatite ne signifie pas une infection par *E. coli*, puisque d'autres microorganismes peuvent aussi être responsables de ces symptômes ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Une aérosacculite peut aussi être causée par *Mycoplasma* et *Chlamydia*, une péricardite peut être due à une infection par *Chlamydia*, tandis que *Pasteurella* et *Salmonella* sont aussi responsables de périhépatite ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)).

1.4.2 L'aérosacculite

L'aérosacculite, parfois appelée la maladie du sac aérien, est une infection du tractus respiratoire des poulets de quatre à neuf semaines causée par les APEC, qui a généralement lieu suite à une infection du tractus respiratoire par *Mycoplasma gallisepticum*, le virus de la maladie de Newcastle (NDV) ou le virus de la bronchite infectieuse (IBV) ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Cette maladie a un taux de mortalité de 20% et cause une perte d'appétit résultant en une diminution du poids de la

volaille ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). De plus, il y a possibilité d'une septicémie si l'infection n'est pas traitée ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). L'infection est causée par l'inhalation de particules d'aïres contaminées par les souches APEC présentes dans les excréments des animaux, et provient généralement d'un manque d'hygiène du lieu d'élevage ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)).

1.4.3 Les infections de la membrane vitelline

L'infection de la membrane vitelline est causée par une contamination fécale de la surface de l'œuf ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Cette infection est plus virulente et mortelle en fin de période d'incubation et cause souvent la mort prématurée de l'embryon ou du poussin jusqu'à trois semaines suivant l'éclosion de l'œuf ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)).

1.4.4 L'infection de l'oviducte

Une infection du sac aérien d'une poule pondeuse peut entraîner une infection de l'oviducte, menant à une salpingite et la perte de la capacité de ponte d'œuf ou à une infection de la cavité péritonéale causant une péritonite et la mort de la poule ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Les bactéries peuvent aussi se déplacer vers l'œuf en formation où elles causeront des dommages à la membrane vitelline ([La Ragione et Woodward, 2002](#)).

1.4.5 La cellulite aviaire

La cellulite aviaire, ou dermatite nécrotique, ne cause généralement pas de mortalité, mais causent des pertes économiques dues au rejet des carcasses et au déclassement de la qualité de la viande ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Cette maladie cause des lésions épidermiques dans l'abdomen inférieur et aux cuisses, occasionnant des plaques fibreuses sous-cutanées ([Gyles, 1994](#); [Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Le sérotype O78 :K80 est le plus fréquemment isolé lors d'une cellulite aviaire, mais les sérotypes O1 et O2 sont parfois retrouvés ([Gyles, 1994](#)).

1.4.6 Le syndrome de la tête enflée

Le syndrome de la tête enflée se manifeste souvent suite à une infection par le virus rhinotrachéite du dindon ou encore par une infection par le virus de la maladie de Newcastle ou le virus de la bronchite infectieuse ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Les symptômes sont la cellulite et de l'œdème de la peau facial et des tissus périorbitaires ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). Tout comme pour la cellulite aviaire, le syndrome de la tête enflée n'est pas mortel, mais cause un rejet des carcasses, ce qui impacte négativement l'économie ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)).

1.5 Les infections urinaires

Il existe trois types d'ITU, soit les bactériuries asymptomatiques (BAS), les ITU symptomatiques sans complications et les ITU symptomatiques avec complications.

1.5.1 Les bactériuries asymptomatiques

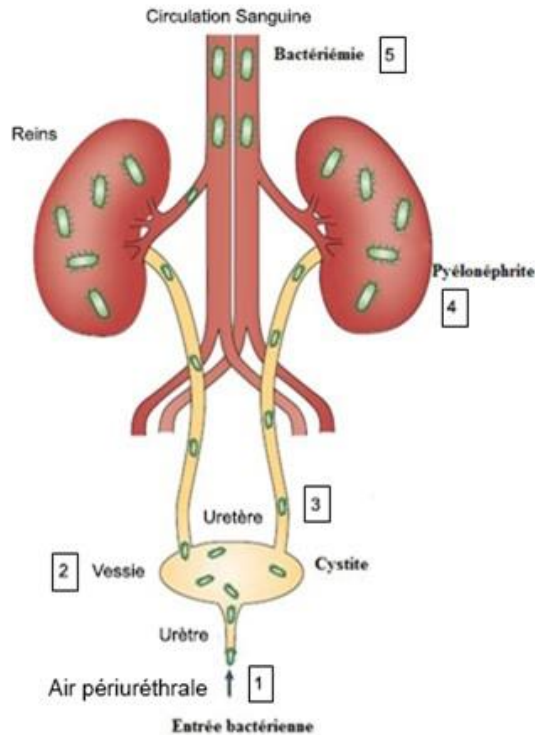
Les bactériuries asymptomatiques impliquent une concentration bactérienne supérieure à 10^5 UFC/ml et sont présentes chez les femmes enceintes, les personnes âgées, les personnes diabétiques et les personnes nécessitant un cathéter urinaire ([Raz, 2003](#); [Colgan et al., 2006](#)). Les bactéries isolées de ces cas présentent une plus faible expression de fimbriae, mais avec une hausse de la croissance ([Roos et al., 2006a](#)). Le génome de ces souches est plus petit que celui des APEC et UPEC isolées de ITU symptomatiques, et les gènes de virulence sont affectés par des délétions, des réarrangements génomiques et par des mutations ponctuelles ([Zdziarski et al., 2008](#)). Des mutations ponctuelles ont eu lieu dans le gène *papG* codant une adhésine du fimbria P ainsi que dans le gène *focD* du fimbriae F1C, tandis qu'une délétion affectant l'opéron *fim*, et la modification de régulateurs globaux comme RfaH peut aussi affecter l'expression des facteurs de virulence ([Roos et al., 2006b](#); [Zdziarski et al., 2008](#)). Les souches causant les BAS semblent avoir évolué à partir de souches pathogènes vers des souches commensales, qui pourraient avoir résulté d'une pression de sélection par

le système immunitaire qui aura éliminé des souches plus virulentes ([Roos et al., 2006a](#); [Zdziarski et al., 2008](#)).

1.5.2 Les ITU symptomatiques avec complications et sans complications

Les ITU symptomatiques avec complications sont caractérisées par des dysfonctionnements physiologiques comme le diabète ou une malformation du tractus urinaire ([Ronald, 2003](#)). L'ITU symptomatique sans complications est une infection ascendante en cinq étapes majeures, représentées dans la [figure 2](#). Premièrement, il y a contamination de l'air périurétrale par une souche UPEC de la flore intestinale ou vaginale et migration le long de l'urètre jusqu'à la vessie, où les bactéries s'attacheront à l'urothélium par le biais des fimbriae de type 1 ([Mulvey et al., 1998](#); [Kaper et al., 2004](#); [Lane et al., 2007](#)). Cette liaison peut induire l'exfoliation et l'apoptose des cellules épithéliales qui réagissent pour se défendre ([Mulvey et al., 1998](#); [Kaper et al., 2004](#); [Lane et al., 2007](#)). La deuxième étape est la multiplication et l'envahissement de la vessie au point de provoquer une cystite, caractérisée par l'inflammation de l'organe, la présence de bactéries dans l'urine, la difficulté de produire une miction et la présence de sang, dans certains cas ([Mulvey et al., 1998](#); [Lane et al., 2007](#)). Troisièmement, les bactéries se déplacent, via les flagelles, vers les reins et, quatrièmement, il y a colonisation des reins où la fixation aux cellules rénales est médiée par les fimbriae P ([Lane et al., 2007](#)). Une pyélonéphrite se développe avec une fièvre, des vomissements et douleurs aux flancs ([Lane et al., 2007](#)). Cinquièmement, si l'infection n'est pas traitée, il y aura endommagement aux reins et passage des bactéries à la circulation sanguine, résultant en une septicémie ([Kaper et al., 2004](#); [Lane et al., 2007](#)). Certaines souches UPEC sont des pathogènes intracellulaires opportunistes, où ces bactéries vont former des inclusions appelées communautés bactériennes intracellulaires (CBI) suite à l'invasion des cellules de la vessie ([Dhakal et al., 2008](#)). Les fimbriae de type 1 causent le réarrangement du cytosquelette de la cellule de la vessie pour créer une vacuole servant de réservoir dormant de bactéries pathogènes où la bactérie est protégée du système immunitaire et des antibiotiques. Les CBI expliqueraient les infections récurrentes par les mêmes souches ([Dhakal et al., 2008](#)). Finalement, des

ITU descendantes, où la bactérie pathogène passe du système sanguin aux reins avant de descendre les uretères vers la vessie, sont très rares et sont souvent causées par *Staphylococcus* spp, *Salmonella* spp. et *Candida* spp. ([Ronald, 2002](#)).



1. Les UPEC ayant colonisés l'intestin contaminent l'air périurétrale et migrent vers la vessie.
2. Il y a adhérence aux cellules urothéliales grâce aux fimbriae de type 1 et P, suivit de la colonisation, invasion et multiplication intracellulaire, résultant en une cystite.
3. Les bactéries empruntent les uretères pour se diriger vers les reins.
4. L'adhérence aux cellules rénales a lieu grâce aux fimbriae P. Il y a colonisation et invasion des reins, résultant en une pyélonéphrite.
5. Les bactéries arrivent à passer la barrière des cellules épithéliales tubulaires, se retrouvent dans la circulation sanguine et cause une bactériémie.

Figure 2 : Les différentes étapes d'une infection du tractus urinaire.

Modifié de ([Kaper et al., 2004](#))

2 Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence donnent aux bactéries la capacité de mieux coloniser et d'envahir des organes dans lesquelles leurs croissances ne sont pas favorables, et ces gènes peuvent être acquis via des plasmides, des bactériophages et des éléments mobiles ([Waters et Crosa, 1991](#)). Un gène de virulence doit répondre au postulat moléculaire de Koch, c'est-à-dire que le gène doit être associé à un trait de virulence, l'absence du gène doit réduire la virulence, et, finalement, la réintroduction du gène doit restaurer la virulence perdue ([Waters et Crosa, 1991](#)).

2.1 Acquisition des facteurs de virulence

2.1.1 Les transferts horizontaux

Le transfert horizontal de gènes a lieu lorsque du matériel génétique est transféré d'un organisme à un autre par une méthode autre que la reproduction ([Heinemann et Bungard, 2006](#)).

Le séquençage de la souche *E. coli* K-12 MG1655 a démontré la présence de gènes de ménages qui sont conservés parmi les genres et les espèces bactériennes, des séquences d'insertions, des duplications de gènes, des éléments transposables et des gènes de bactériophages ([Blattner et al., 1997](#); [Lawrence et Ochman, 1998](#)). Le pourcentage de GC est spécifique pour chaque espèce, et ceci peut être différent pour les gènes acquis d'autres espèces puisque les gènes reçus auront le pourcentage de GC de la souche donneuse ([Bergthorsson et Ochman, 1998](#)).

Les bactériophages tempérés, des virus spécifiques aux bactéries, intègrent leur génome dans le chromosome bactérien pour le répliquer, donnant l'opportunité aux phages de retirer quelques gènes bactériens et de les transférer à une autre bactérie lors de son infection, qui elle peut incorporer ces gènes de façon permanente ([Lawrence et Ochman, 1998](#)). Le transfert de gènes de virulence peut transformer une souche commensale en une souche pathogène, mais peut aussi rendre une souche déjà pathogène encore plus virulente, tel le cas de la souche O157 :H7, où l'acquisition

des gènes de la toxine Shiga lors d'une infection par un bactériophage a rendu la souche EPEC O55 :H7 plus virulente ([Lawrence et Ochman, 1998](#)).

Le transfert de plasmides permet aussi l'acquisition de gènes, comme le plasmide ColV qui confère divers avantages à la souche receveuse, telles la production de toxines, la résistance au sérum et une adhérence accrue aux cellules cibles ([Waters et Crosa, 1991](#)).

Le transfert de gènes n'est pas limité aux gènes de virulence, car des gènes de métabolisme, tel l'opéron *lac* nécessaire pour la métabolisation du lactose ou le gène *argF* nécessaire à la synthèse de l'arginine, proviennent de transfert horizontal ([Bergthorsson et Ochman, 1998](#)).

Le transfert de gènes donne un avantage aux souches receveuses qui pourront maintenant mieux utiliser les ressources environnementales et mène à la colonisation de nouvelles niches ([Bergthorsson et Ochman, 1998](#)).

2.1.2 Les îlots de pathogénicité

Un îlot de pathogénicité (IPA) est un regroupement de gènes de virulence qui a été acquis par un transfert horizontal, souvent par l'intégration d'ADN provenant de bactériophages, de plasmides et/ou d'éléments mobiles ([Hacker et Kaper, 2000](#)). Des séquences répétées au niveau des gènes codant des ARN de transfert (ARNt) sont souvent ciblées par les bactériophages pour l'insertion des IPA ([Hacker et Kaper, 2000](#)). Le LEE des EHEC et EPEC se retrouvent au même endroit du chromosome qu'un îlot de pathogénicité retrouvé chez les UPEC ([Hacker et Kaper, 2000](#)). Il est intéressant à noter que certains gènes des IPA modifient l'antigène O ou K de la souche, ce qui crée une association entre le sérotype et la virulence, même si le sérotype n'attribue pas la virulence d'une souche ([Hacker et Kaper, 2000](#)).

La perte d'une partie du génome, tout comme l'acquisition de gènes, peut être bénéfique à la souche, comme la perte de certains gènes métaboliques chez les EIEC et *Shigella flexneri* dont les produits métaboliques réduisaient la virulence de ces pathotypes ([Maurelli et al., 1998](#)). Environ 90% des souches d'*E. coli* possèdent la

lysine décarboxylase (LDC) codée par le gène *cadA*, et celle-ci est absente chez presque toutes les souches de *Shigella*. L'introduction du gène *cadA* chez *S. flexneri* a causé l'inhibition de l'activité d'une entérotoxine résultant en l'atténuation de la virulence de la souche, et ceci était due par la présence de cadavérine, produit de la réaction catalysée par la LDC capable d'inhiber l'activité de l'entérotoxine ([Maurelli et al., 1998](#)). La perte du gène *cadA* détectée chez les EIEC et *Shigella*, qui a évolué à partir d'*E. coli* pour devenir pathogène, est un exemple où la perte de gènes peut permettre une augmentation de la virulence ([Maurelli et al., 1998](#)).

2.1.3 Les séquences d'insertions

Les séquences d'insertions (IS) sont des éléments mobiles de l'ADN composées d'un gène codant une transposase entouré par des séquences répétées terminales reconnues par la transposase ([Siquier et al., 2006](#)). Plus de 1500 IS existent appartenant à une vingtaine de famille, classé selon le pourcentage d'identité de la séquence du gène de la transposase, de la conservation du site catalytique et l'organisation et la conservation des séquences répétées terminales ([Siquier et al., 2006](#)). L'arrangement génomique, tel les délétions, insertions et fusions de réplicons produit par les IS est responsable des mutants générés et s'effectue dans les régions de l'ADN riche en A+T. D'habitude, seul le gène codant la transposase est transféré, mais un segment d'ADN flanqué par deux IS peut aussi subir une translocation et ce segment devient un transposon ([Siquier et al., 2006](#)). Les IS/transposons transposent généralement des gènes de métabolisme et des gènes de résistance aux antibiotiques, et rarement des îlots de pathogénicité puisque ces fragments excèdent 2.5 kb et leur déplacement est plus difficile ([Mahillon et al., 1999](#); [Siquier et al., 2006](#)). Les IS contribuent à l'évolution des îlots de pathogénicité, car, dans certains cas, ils sont à la base de la formation de l'IPA via d'insertions de plusieurs gènes séparément, où un exemple serait les gènes codant l'aérobactine retrouvé sur le plasmide ColV ([Mahillon et al., 1999](#)).

2.2 Facteurs de virulence des UPEC

2.2.1 Les systèmes d'acquisition de fer

Le fer, un élément essentiel pour la vie des organismes, se retrouve sous forme d'hydroxyde insoluble dans l'environnement ([Koster, 2001](#)). Le degré de son importance fait en sorte que l'hôte séquestre le fer et diminue la concentration entre 10^{-18} et 10^{-24} M, concentration qui varie selon l'organe et le système biologique, et ceci agit donc comme une barrière contre les infections, puisque des microorganismes tels qu'*Escherichia coli* nécessite une concentration de fer d'au moins 10^{-6} M ([Koster, 2001](#)). Afin de pouvoir contrecarrer la carence en fer chez l'hôte, les bactéries synthétisent des sidérophores, des petites molécules d'acquisition du fer, d'une taille inférieure à 1000 Da, capables de compétitionner, grâce à leur forte affinité pour le Fe^{3+} , avec les protéines de séquestration du fer produit par l'hôte, tels que la transferrine et la lactoferrine, et ainsi capter le fer pour l'utilisation de la bactérie ([Andrews et al., 2003](#); [Wiles et al., 2008](#); [Garenaux et al., 2011](#); [Caza et al., 2015](#)).

2.2.1.1 L'entérobactine

L'entérobactine, un sidérophore découvert en 1970 faisant partie de la famille des catécholates, est produit par presque toutes les souches d'*E. coli*, mais aussi chez *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella* et d'autres entérobactéries ([Wiles et al., 2008](#)). L'entérobactine est une molécule cyclique composée de trois unités 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) liées par des liaisons ester, où les groupes catécholates lient l'ion de fer. L'entérobactine est synthétisée par les gènes *entABCDEFS* ([Crosa et Walsh, 2002](#); [Wiles et al., 2008](#)). La synthèse de l'entérobactine, divisée en deux phases, commence avec l'isomérisation du chorismate, un dérivé enzymatique de l'acide shikimique, par l'isochorismate synthase EntC ([Sakaitani et al., 1990](#)). Une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthase, codée par *entB*, convertit le chorismate en 2,3-dihydro-2,3-dihydrobenzoate (2,3-diDHB) qui sera oxydé par une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate déshydrogénase, codée par *entA*, en 2,3-dihydroxybenzoate (2,3-DHB) ([Sakaitani et al., 1990](#)). En deuxième lieu, EntE, une

2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase, active 2,3-DHB par l'ajout d'un groupe AMP pour former 2,3-DHB-AMP ([Roche et Walsh, 2003](#)). EntD, une phosphopantetheinyl transférase (Ppant), ajoute un groupement phosphopantetheinyl à EntB et EntF, pour que ces deux protéines prennent la forme holo au lieu de apo ([Gehring et al., 1997](#); [Gehring et al., 1998](#)). Le transfert d'une chaîne acyle par EntB et EntF constitue l'étape finale de la formation de l'entérobactine ([Gehring et al., 1997](#); [Gehring et al., 1998](#)).

Tandis que l'affinité des protéines de séquestration de fer a une K_d d'environ 10^{-20} M, l'entérobactine a une K_d de 10^{-52} M, la rendant beaucoup plus efficace pour capter le fer que les protéines de l'hôte ([Johnson, 1991](#); [Wiles et al., 2008](#)). Toutefois, l'hôte peut contrer cette molécule en produisant la lipocaline-2, aussi connu comme NGAL, dont l'activité bactériostatique consiste à lier l'entérobactine, diminuant ainsi l'import de fer par la bactérie ([Wiles et al., 2008](#)). Cette petite molécule de 25 kDa est produite par les précurseurs de neutrophiles matures, entreposée dans des granules spécifiques et relâchée lors de l'activation des neutrophiles durant la réponse immunitaire innée ([Valdebenito et al., 2007](#)).

L'entérobactine est présente chez les souches pathogènes et non pathogènes d'*E. coli*, et son rôle dans la virulence n'est pas établi. Certaines études chez *Salmonella Typhimurium* démontrent que l'entérobactine est importante pour la virulence dans le modèle murin, tandis que d'autres études indiquent que ce sidérophore n'est pas important pour la virulence ([Garenaux et al., 2011](#)). L'entérobactine joue un rôle négligeable dans la virulence, puisqu'une souche productrice d'entérobactine, mais mutante pour la production d'aérobactine et salmochéline, est atténuée dans le modèle d'infection systémique aviaire ([Caza et al., 2011](#); [Garenaux et al., 2011](#)). L'entérobactine ne serait donc pas suffisante pour la survie systémique d'une souche APEC ([Caza et al., 2011](#)). Ce faible rôle dans la virulence est attribué à la séquestration de l'entérobactine par les protéines du système immunitaire de l'hôte, notamment le NGAL et l'albumine du sérum ([Caza et al., 2008](#); [Garenaux et al., 2011](#)).

2.2.1.2 Les salmochélines

Les salmochélines sont des dérivés de l'entérobactine qui sont glycosylés par la protéine IroB, une glycosyl-transférase, qui est capable de générer des entérobactines monoglycosylées (MGE), des entérobactines diglycosylées (DGE) ou des entérobactines triglycosylées (TGE) ([Hantke et al., 2003](#); [Wiles et al., 2008](#)). Cette glycosylation cause un encombrement stérique empêchant la reconnaissance par la lipocaline-2 et semble être une réponse évolutive face à la réponse de l'hôte ([Hantke et al., 2003](#); [Wiles et al., 2008](#)). Les gènes *iroN* et *iroBCDE* forme un locus nécessaire pour la synthèse, le transport et la dégradation des salmochélines, et ce locus est important pour la virulence de certains pathotypes, tels que les APEC et UPEC ([Hantke et al., 2003](#); [Wiles et al., 2008](#)).

Les salmochélines sont responsables de la virulence chez les ExPEC et les gènes nécessaires se retrouvent sur les plasmides de virulence ColV ou ColBM, mais peuvent parfois se retrouver sur des îlots de pathogénicité chromosomique. Le récepteur de la salmochéline, IroN, est important pour la virulence des souches UPEC CP9 et NMEC S88, et il est surexprimé dans les communautés bactériennes intracellulaires lors d'une infection du tractus urinaire par la souche UPEC UTI89, et ce, dans le modèle UTI murin ([Dozois et al., 2003](#); [Garenaux et al., 2011](#)).

2.2.1.3 L'aérobactine

L'aérobactine, un sidérophore de la famille des citrates hydroxamates, fut découvert chez *Aerobacter aerogenes*, et son expression chez *Escherichia coli* dépend de la présence du locus *iuc*, codant quatre gènes de synthèse, et du locus *iut*, codant un gène de transport ([Johnson, 1991](#)). Les deux locus, chez les APEC, sont situés sur le plasmide de virulence ColV, mais une copie presque identique se retrouve sur le chromosome des NMEC, des UPEC et des *E. coli* entéroinvasives, démontrant ainsi le potentiel de transposition des gènes du plasmide au chromosome, notamment ceux codant des facteurs de virulence ([Johnson, 1991](#)). L'aérobactine est composée de la liaison d'une molécule de citrate à deux molécules de lysines, et, dans le sérum ou à

pH neutre, son affinité pour le fer est supérieure à l'entérobactine ([Johnson, 1991](#)). L'aérobactine, contrairement aux sidérophores de type catécholate, ne subit pas de dégradation pour relâcher le fer capté, permettant ainsi un recyclage du sidérophore et une économie d'énergie ([Williams et Carbonetti, 1986](#)). Un autre avantage de l'aérobactine est que, malgré une constante d'affinité inférieure à l'entérobactine, soit de 10^{-23} M, l'aérobactine est plus stable et plus soluble que l'entérobactine ([Williams et Carbonetti, 1986](#)). L'aérobactine est un facteur de virulence important chez les ExPEC, plus particulièrement les APEC et UPEC, où plus de 70% des souches APEC codent pour l'aérobactine ([Johnson, 1991](#); [Waters et Crosa, 1991](#)). La redondance des systèmes d'acquisition du fer chez les UPEC, notamment chez la souche CFT073, diminue l'importance de l'aérobactine dans une infection puisque d'autres systèmes sont présents pour capter le fer en cas de dysfonctionnement de l'aérobactine ([Johnson, 1991](#); [Waters et Crosa, 1991](#)). La présence de plusieurs sidérophores chez une souche permet une meilleure adaptation puisque chacun peut être une meilleure option en fonction de l'environnement ([Gareaux et al., 2011](#)). De plus, la présence de plusieurs sidérophores permet à la bactérie d'utiliser différentes sources de fer, où l'entérobactine séquestre le fer extracellulaire et lié à la transferrine, tandis que l'aérobactine séquestre le fer à partir de complexes de fer intracellulaire de l'hôte ([Torres et al., 2001](#)). L'aérobactine couplée au fer est reconnue par lutA, un transporteur qui permettra l'internalisation de celle-ci ([Braun, 2003](#)).

Tout comme pour la salmochéline, les gènes codants pour l'aérobactine se retrouvent sur les plasmides de virulence ColV ou ColBM, mais aussi dans les îlots de pathogénicité chromosomique ([Johnson et al., 2006b](#); [Gareaux et al., 2011](#)). Ce sidérophore est important tant pour la virulence des APEC que des UPEC et contribue à l'absorption du fer *in vivo* lors d'une infection urinaire ([Dozois et al., 2003](#); [Gareaux et al., 2011](#)). Contrairement à l'entérobactine, de faibles concentrations d'aérobactine sont suffisantes pour stimuler la croissance bactérienne et elle ne forme pas de liaison avec l'albumine du sérum et permet donc à la bactérie de compétitionner les protéines de l'hôte pour l'acquisition du fer dans le sérum ([Gareaux et al., 2011](#)). La survie de la souche APEC χ 7122, mutée pour la production d'entérobactine et de salmochéline, n'est pas affectée dans le modèle d'infection aviaire et cause une infection systémique

similaire à la souche sauvage ([Caza et al., 2011](#)). Toutefois, la souche χ 7122 mutée pour la production d'aérobactine, mais capable de produire l'entérobactine et la salmochéline, est aussi virulente que la souche sauvage ([Caza et al., 2011](#)).

2.2.1.4 La yersiniabactine

La yersiniabactine, isolée chez *Yersinia enterocolitica*, fait partie de la famille des catéchols et les gènes codant pour ce système se trouvent sur un îlot de pathogénicité ([Heesemann et al., 1993](#)). Une valeur K_d de 10^{-36} M lui donne une forte affinité pour le fer et lui permet de compétitionner contre la transferrine et la lactoferrine de l'hôte ([Miller et al., 2010](#)). En plus de fournir du fer à la bactérie, la capture du fer de l'environnement empêche la production de radicaux hydroxyles par les leucocytes, augmentant la survie de la bactérie. Ce sidérophore possède aussi un rôle dans la formation de biofilm, important dans la colonisation du tractus urinaire par les UPEC ([Miller et al., 2010](#)). La yersiniabactine joue un rôle important dans la virulence des UPEC où elle permet l'absorption du fer *in vivo* par la bactérie et, en réduisant la quantité de fer disponible dans le milieu extracellulaire, elle réduit la formation des espèces réactives d'oxygène par les leucocytes polymorphonucléaires, les monocytes et les macrophages ([Garenaux et al., 2011](#)). Le récepteur FyuA est nécessaire pour transporter la yersiniabactine suite à sa liaison avec le fer ([Braun, 2003](#)).

Ces quatre systèmes d'acquisition du fer sont régulés par la protéine Fur, dépendante de la concentration intracellulaire du fer, où une concentration élevée permet la répression de ces gènes et une faible concentration permet la synthèse de ces gènes ([Johnson, 1991](#)). De plus, la présence de plusieurs systèmes ainsi que les modifications des sidérophores est un bon exemple de l'équilibre évolutif existant entre les bactéries et l'hôte, où chacun essaie de contrer les mécanismes de l'autre et ainsi avoir l'avantage lors d'une infection. La [figure 3](#) montre la structure des sidérophores mentionnés.

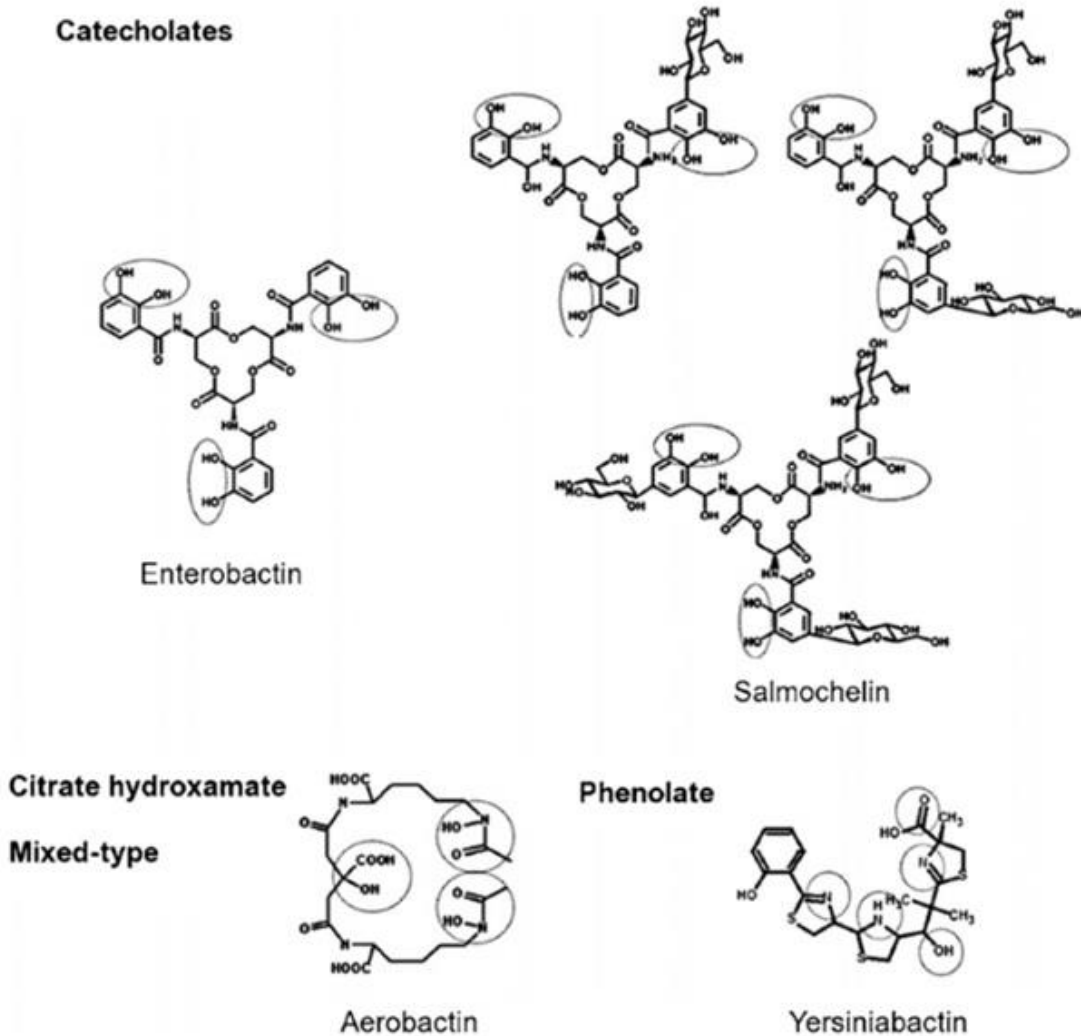


Figure 3 : Structure chimique des sidérophores synthétisés par certaines souches d' *E. coli* pathogènes, soit l'entérobactine, les trois formes des salmochélines (MGE, DGE et TGE), l'aérobactine et la yersiniabactine. Les cercles identifient les sites de liaisons du fer ([Garenaux et al., 2011](#)).

Le fer est un cofacteur essentiel pour plusieurs réactions cellulaires, mais il est toxique en condition aérobie puisqu'il y aura génération de réactif d'oxygène menant à un stress oxydatif ([Porcheron et al., 2014](#)). Chez *E. coli*, l'acquisition et le stockage du fer sont régulés par Fur (Ferric uptake regulator) et RyhB, un petit ARN non codant responsable de la régulation de plusieurs gènes en réponse à la disponibilité du fer ([Porcheron et al., 2014](#)). En présence de fer, Fur forme un complexe avec Fe^{2+} et agit

en tant que régulateur négatif du gène *ryhB* et des gènes nécessaires à l'acquisition du fer, tandis qu'en faible concentration de fer, Fur est inactif et RyhB et les protéines nécessaires à l'acquisition du fer sont exprimés afin de rétablir l'homéostasie du fer ([Porcheron et al., 2014](#)). Fur est aussi un régulateur pour les gènes de voies métaboliques, de tolérance à l'acide, de facteurs de virulence et de protection contre le stress oxydatif, et ce, aussi chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica* ([Porcheron et al., 2014](#)).

RyhB induit la répression des protéines non essentielles utilisant le fer, permettant le bon fonctionnement des protéines essentielles utilisant le fer nécessaires aux fonctions biologiques importantes telles que la respiration, le transport d'oxygène et la biosynthèse de l'ADN ([Masse et al., 2007](#); [Porcheron et al., 2014](#)). RyhB est aussi important pour la synthèse des sidérophores en condition faible en fer, tant pour les souches d'*E. coli* K-12 non pathogènes que pour les souches pathogènes telles que la souche UPEC CFT073 ([Porcheron et al., 2014](#)).

Chez *E. coli*, TonB est une protéine membranaire dont le rôle est de fournir l'énergie aux récepteurs de la membrane externe nécessaire au transport de haute affinité et l'utilisation de plusieurs nutriments, incluant la chélation du fer et la vitamine B₁₂ ([Torres et al., 2001](#)). La protéine TonB fait partie du système Ton, et agit en synergie avec les protéines ExbB et ExbD, à un ratio molaire de 1 :7 :2, en réponse à la force proton motrice ([Braun et Braun, 2002](#); [Braun, 2003](#)). Lors d'une infection du tractus urinaire par la souche CFT073, TonB est important pour l'acquisition du fer *in vivo* lors de la colonisation et multiplication cellulaire, et un mutant *tonB* est atténué dans le modèle UTI ([Torres et al., 2001](#)). *In vivo*, l'hème est la source de fer la plus abondante et le système de transport de fer Chu, où la protéine ChuA est le récepteur reconnaissant l'hème, est important dans la virulence des souches ExPEC et il est aussi utilisé par les EHEC. L'expression du système de transport de l'hème augmente lorsque la concentration de fer est faible ([Clarke et al., 2001](#); [Torres et al., 2001](#)).

Hagan et Mobley ont identifié un autre récepteur de l'hème chez *E. coli* CFT073, Hma (« heme acquisition protein »), dont l'affinité pour l'hème est très élevée (K_d de 8 µM) et le fonctionnement est indépendant de ChuA ([Hagan et Mobley, 2009](#)). Hma est

aussi présent chez la majorité des souches UPEC séquencées, ainsi que chez les souches d'*E. coli* entérohémorragiques ([Hagan et Mobley, 2009](#)). L'acquisition de l'hème est importante lors d'une infection, et le double mutant *hma/chuA* est atténué dans le modèle d'infection du tractus urinaire comparativement à la souche sauvage, tandis que le simple mutant colonise à un niveau semblable à la souche sauvage ([Hagan et Mobley, 2009](#)). Malgré le fait que ChuA semble contribuer plus à capter l'hème *in vivo*, notamment à cause de l'ampleur plus élevée de la régulation positive en condition restreinte en fer, un mutant *chuA* exprimant Hma est capable de coloniser les reins au même niveau que la souche sauvage ([Hagan et Mobley, 2009](#)). Toutefois, même si les gènes d'acquisition de l'hème sont exprimés dans la vessie, ils ne semblent pas jouer un rôle dans la colonisation de celle-ci, car les sources de fer majoritaires de la vessie ne proviennent pas de l'hème ([Hagan et Mobley, 2009](#)).

Trois autres molécules importantes dans l'acquisition du fer et dépendant de TonB sont FhuA, qui transporte le ferrichrome, un sidérophore de type hydroxymate, FepA qui transporte l'entérobactine et FecA qui transporte le citrate ferrique dinucléaire ([Braun et Braun, 2002](#); [Braun, 2003](#)). FhuA est aussi responsable du transport des antibiotiques albomycine et rifamycine, de la colicine M et de la microcine J25, et sert de récepteur aux phages T1, T5, phi80 et UC-1 ([Braun, 2003](#)). FepA sert aussi de transporteur pour les colicines B et D ([Braun, 2003](#)). FecA est aussi une protéine de signalisation responsable de l'initiation de la transcription des gènes du transport du citrate ferrique, *fecABCDE*, où FecB est une protéine périplasmique, FecC et FecD sont des protéines de transport de la membrane cytoplasmique et FecE est une ATPase associée à la partie interne de la membrane cytoplasmique ([Braun et Braun, 2002](#); [Braun, 2003](#)). La protéine de transport de la membrane externe FecA est importante lorsque la seule source de fer est le citrate ferrique et que celle-ci est présente en faible concentration, mais lorsque la concentration du citrate ferrique est élevée, celui-ci peut diffuser rapidement à travers les pores de la bactérie ([Braun, 2003](#)).

2.2.2 Les flagelles

Les flagelles, codés par une quarantaine de gènes, sont composés de trois parties, soit le corps basal, le crochet et le filament flagellaire constitué de flagelline et composante de l'antigène H ([Macnab, 2003](#)). Le filament externe du flagelle a une longueur de 10 à 15 µm et un diamètre de 20 nm ([Macnab, 1999](#); [Chevance et Hughes, 2008](#)). Les flagelles péritriches chez *E. coli* sont distribués partout sur la bactérie ([Chevance et Hughes, 2008](#)).

Les flagelles permettent la mobilité bactérienne par chimiotactisme. Des protéines membranaires sont responsables de la détection de stimuli, telles que la disponibilité des nutriments ou la présence de composé dangereux, et transmettent un signal aux flagelles, permettant ainsi aux bactéries de se déplacer vers une source de nutriment ou loin d'un environnement néfaste ([Macnab, 2003](#)). En absence de stimuli, la bactérie se déplace en direction aléatoire ([Macnab, 2003](#)).

La mobilité permet aux bactéries de passer à travers le mucus, une barrière de défense de l'hôte ([La Ragione et Woodward, 2002](#)). Les flagelles sont importants dans la phase d'infection tardive des UPEC, lorsque les bactéries se déplacent vers les reins, mais ne sont pas importants pour la colonisation du tractus urinaire ([Lane et al., 2007](#)). Les flagelles n'ont aucun rôle dans la formation et propagation des IBC, mais donnent un avantage pour la persistance sur une longue période ([Wright et al., 2005](#)). Chez les NMEC, la liaison de la flagelline aux cellules de la barrière hématoencéphalique déclenche le processus permettant aux bactéries de traverser cette barrière ([Parthasarathy et al., 2007](#)).

2.2.3 Les toxines

2.2.3.1 HlyA

L'hémolysine A d'*E. coli*, une toxine RTX codée par l'opéron *hlyCABD*, est présente chez environ 50% des souches UPEC causant des infections du tractus urinaire supérieur (pyélonéphrite), le tiers des UPEC causant des infections du tractus urinaire inférieur (cystite) et chez 10% des isolats fécaux ([Wiles et al., 2008](#); [Gur et al., 2013](#)). La souche UPEC 536 possède deux copies de l'opéron *hlyCABD* ([Wiles et al., 2008](#)). Le mécanisme d'action d'HlyA sera mieux décrit plus loin, cette section présentera des généralités sur la toxine. L'hémolysine forme un pore de 2 nm dans la membrane des cellules cibles menant à la lyse cellulaire et au relâchement de nutriment que la bactérie pourra utiliser, par exemple le relâchement du fer suite à la lyse des érythrocytes ([Johnson, 1991](#)). La toxine permet aussi une exfoliation des cellules de l'urothélium, endommage les cellules rénales afin de faciliter la translocation au système sanguin et causer une septicémie et, finalement, la lyse de macrophages réduit le niveau de phagocytose ([Johnson, 1991](#)). L'effet cytotoxique de HlyA permet aux UPEC d'endommager les cellules immunitaires de l'hôte afin de mieux survivre, facilite le passage à travers la barrière muqueuse et donne, à la bactérie, accès aux nutriments de l'hôte tel que le fer ([Bien et al., 2012](#)). La toxine HlyA est aussi responsable de cicatrices rénales permanentes, une complication fréquente suite à une infection par des UPEC produisant HlyA ([Bien et al., 2012](#)). HlyA peut aussi causer une altération du cycle cellulaire, du métabolisme cellulaire, du trafic vésiculaire, la survie et la réponse inflammatoire des cellules de l'hôte ([Wiles et al., 2008](#)).

2.2.3.2 Le facteur nécrosant cytotoxique 1

La synthèse du facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF1) nécessite le gène *cnf1* qui se trouve, chez certaines souches UPEC, sur un IPA à la suite de l'opéron *hlyCABD*. CNF1 est transcrit sur un seul ARN messager avec les gènes de l'hémolysine ([Lemonnier et al., 2007](#)). CNF1 est retrouvé chez plus du tiers des souches UPEC et chez plus de 50% des souches hémolytiques ([Lemonnier et al.,](#)

[2007](#)). En 1983, Caprioli et al. ont démontré que cette toxine induit la modification de la morphologie des cellules eucaryotes ([Caprioli et al., 1983](#)). CNF1, une fois dans le cytoplasme de la cellule cible, cause l'activation permanente des GTPases Rho par une modification post-traductionnelle, perturbant ainsi les fonctions cellulaires tels que le maintien du cytosquelette et la production d'immunomodulateurs ([Lemonnier et al., 2007](#)). Cette perturbation des fonctions cellulaires mène à l'apoptose des cellules cibles et diminue la phagocytose par les leucocytes polymorphonucléaires et le relâchement d'espèces réactives de l'oxygène, minimisant ainsi la réponse inflammatoire de l'hôte ([Lemonnier et al., 2007](#)). La baisse de la réponse inflammatoire explique l'importance de CNF1 dans l'invasion et la colonisation du tractus urinaire ([Lemonnier et al., 2007](#)).

2.2.3.3 Les toxines Sat et Vat

Sat (« secreted autotransporter toxin ») et Vat (« vacuolating autotransporter toxin ») font partie de la famille des autotransporteurs, des protéines ayant les domaines nécessaires à leur propre sécrétion à l'extérieur de la cellule, et plus spécifiquement de la sous-famille des SPATE (« serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae ») puisqu'elles possèdent un motif sérine ayant une activité protéolytique ([Guyer et al., 2000](#)). La famille des SPATE est divisée en deux classes, classe I et II, selon la structure et l'activité de la toxine. Sat des UPEC fait partie de la classe 1 tandis que Vat fait partie de la classe II ([Guyer et al., 2000](#); [Dutta et al., 2002](#)). Les autres membres de la classe I inclut la toxine Pet (« plasmid encoded toxin ») des EAEC, la sérine protéase plasmidique extracellulaire EspP (« extracellular serine protease ») des EHEC, EspC des EPEC, Afa/Dr des DAEC et SigA de *Shigella flexneri* ([Lievin-Le Moal et al., 2011](#)). L'export nécessite le système de sécrétion de type V Sec dépendant dont les protéines seront recrutées à la membrane interne de la bactérie par le biais d'un signal peptide en position N-terminale de la toxine ([Guyer et al., 2000](#); [Henderson et al., 2004](#)). Suite à la formation d'un pore par la partie C-terminale, le signal peptide en C-terminal sera clivé permettant la sécrétion, dans l'espace extracellulaire, du domaine passager, soit les toxines Sat et Vat ([Guyer et al., 2000](#)).

La protéine Sat fut découverte chez la souche UPEC CFT073 où elle est codée sur l'îlot de pathogénicité II chromosomique (PAI-II_{CFT073}) et possède une activité cytotoxique envers les cellules de la vessie et des reins ([Guyer et al., 2000](#)). Sat est aussi retrouvé chez d'autres *E. coli* pathogènes, dont les *E. coli* entéroaggrégatives ainsi que chez certains isolats de *Shigella* ([Lievin-Le Moal et al., 2011](#)). Sat modifie le cytosquelette, causant une perte des jonctions cellulaires, une production de vacuoles et cause aussi la disparition de la membrane glomérulaire, facilitant ainsi le passage au système sanguin ([Guyer et al., 2000](#)). Les effets biochimiques de Sat *in vitro* incluent la dégradation de la caséine, la spectrine, la fodrine et le facteur de coagulation V, mais n'a aucun effet sur la mucine et la pepsine ([Lievin-Le Moal et al., 2011](#)). Il a aussi été démontré que Sat induit l'autophagie, soit la dégradation et recyclage des composantes cellulaires, avant qu'il y ait détachement cellulaire ([Lievin-Le Moal et al., 2011](#)). Le rôle de Sat dans les infections du tractus urinaire est encore inconnu ([Guyer et al., 2002](#)).

Vat, tout comme Sat, est exprimé sur un IPA chromosomique et cause la formation de vacuoles intracellulaires suite à une modification du cytosquelette de la cellule cible ([Parreira et Gyles, 2003](#)). Vat semble causer un délai dans l'infiltration des neutrophiles en réponse à une infection en clivant les glycoprotéines de surface des leucocytes impliqués dans le recrutement et migration des neutrophiles ([Ruiz-Perez et al., 2011](#)). Vat est 75% homologue à l'autotransporteur Tsh ([Parreira et Gyles, 2003](#)). De plus, l'activité cytotoxique de Vat ainsi que sa thermolabilité et sa susceptibilité aux enzymes protéolytiques sont similaires à ceux de l'autotransporteur VacA d'*Helicobacter pylori* ([Parreira et Gyles, 2003](#); [Henderson et al., 2004](#)). Cette toxine est importante dans les infections aviaires, principalement les infections respiratoires et cellulites, et son rôle lors des infections du tractus urinaire reste à être démontré, malgré le fait qu'il y a expression lors des ITU ([Parreira et Gyles, 2003](#); [Wiles et al., 2008](#)). Vat semble surtout se trouver chez les souches pathogènes causant une septicémie et serait important pour l'entrée ou la survie dans le sang ([Henderson et al., 2004](#)).

Malgré le fait qu'un rôle important dans l'infection du tractus urinaire n'est pas encore démontré, ces deux autotransporteurs se retrouvent principalement dans les

sérogroupe B2 et D, associés aux souches ExPEC, et Sat et Vat sont conservés chez les souches UPEC, ce qui incline à penser qu'elles ont un rôle dans la virulence, mais celui-ci n'est pas encore connu ([Restieri et al., 2007](#)).

2.2.3.4 L'adhésine afimbriaire Iha

L'adhésine Iha est une protéine membranaire se retrouvant chez environ 55% des souches UPEC et permet, à une bactérie non adhérente, d'adhérer aux cellules de vessie et de reins ([Johnson et al., 2005](#)). L'adhésine sert aussi de récepteur pour l'entérobactine, permettant à la bactérie de récupérer le fer que le sidérophore capte ([Leveille et al., 2006](#)).

2.3 Les facteurs de virulences des APEC

Les principaux facteurs de virulence des APEC impliqués lors de l'établissement d'une infection sont le plasmide ColV, les fimbriae de type 1, type P et curli, l'aérobactine, les salmochélines, l'antigène capsulaire K, l'hémagglutinine thermosensible Tsh, l'autrotransporteur Vat, la résistance aux phagocytes et la résistance au sérum ([Dozois et al., 2003](#); [Caza et al., 2008](#)).

2.3.1 Les plasmides de virulence (plasmides ColV et autres)

Les plasmides ColV et plasmides de virulence semblables tel que ColBM contribuent à la virulence des souches APEC puisqu'il permet à une souche le possédant de causer une infection, contrairement à une souche qui ne le possède pas ([Dozois et al., 2000](#)). Ces plasmides de grande taille codent plusieurs facteurs de virulence tels que l'aérobactine, Tsh, ainsi que des gènes conférant une résistance au sérum et le transporteur de métaux SitABCD ([Dozois et al., 2000](#); [Sabri et al., 2008](#)). Le plasmide code aussi pour la colicine V, une bactériocine produite par la souche *E. coli* qui cible et tue d'autres souches d'*E. coli*, mais le rôle de la colicine dans la virulence n'est pas encore établie ([Dozois et al., 2000](#)). Certains plasmides ColV code aussi pour les salmochélines, le système de transport de fer EitABCD, l'hémolysine putative HlyF

et la protéase de la membrane externe OmpT ([Johnson et al., 2006a](#)). Le plasmide ColBM code pour les colicines B et M, l'aérobactine, Tsh, le système de transport de type ABC (ATP binding cassette) EtsABC, SitABCD, l'aérobactine, les salmochélines, EitABCD et les gènes permettant la résistance au sérum ([Johnson et al., 2006a](#)). Des séquences vestiges d'un système ColV sont présentes sur le plasmide ColBM, indiquant que le plasmide ColBM est probablement un dérivé d'un plasmide ColV qui a hérité les gènes codants pour les colicines BM ([Johnson et al., 2006a](#)). Des séquences d'insertions retrouvées dans le plasmide ColBM seraient la source de transfert de certains des gènes de virulence retrouvés sur ce plasmide ([Johnson et al., 2006a](#)). De plus, 67% des protéines sont communes aux deux plasmides, supportant l'idée que le plasmide ColBM provient du plasmide ColV ([Johnson et al., 2006a](#)).

2.3.2 Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont des adhésines codées par les gènes *fim* et permettent aux bactéries d'adhérer à plusieurs types de cellules, en particulier les érythrocytes et les levures ([Dozois et al., 1995](#); [Neidhardt et Curtiss, 1996](#)). L'adhésion est inhibée en présence de mannose faisant en sorte que l'adhérence est appelée adhérence mannose-sensible ou adhérence mannose-spécifique ([Dozois et al., 1995](#); [Neidhardt et Curtiss, 1996](#)). Les fimbriae sont aussi reconnues comme des hémagglutinines mannose-sensible (MSHA) ([Dozois et al., 1995](#); [Neidhardt et Curtiss, 1996](#)). Les fimbriae de type 1 sont importants pour la colonisation du tractus respiratoire supérieur où ils sont nécessaires pour l'adhésion et la colonisation de la trachée, des sacs aériens et des poumons, ainsi qu'à la progression de l'infection vers une septicémie ([Dozois et al., 1992](#); [Dozois et al., 1994](#); [Pourbakhsh et al., 1997](#)).

2.3.3 Les fimbriae P

Les fimbriae, des hémagglutinines de type mannose-résistant (MRHA) codés par les gènes *pap*, sont synthétisés dans les poumons, les reins, le sang et le fluide péricardique durant l'infection, et sont donc associés à la septicémie, étape tardive de l'infection. Au niveau des poumons, les fimbriae P permettent l'adhésion aux cellules

épithéliales des sacs aériens, mais n'ont aucun effet sur les cellules épithéliales de la trachée ([Dozois et al., 1992](#)). L'expression dans les reins permet la colonisation de l'organe et ces fimbriae sont donc importants dans l'étape tardive de l'infection du tractus urinaire par les UPEC ([Dozois et al., 1995](#)).

2.3.4 Les fimbriae curli

Les fimbriae curli, des hémagglutinines mannose-résistant codés par les gènes *csg*, lient la fibronectine, la laminine, le plasminogène, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1), et l'épithélium intestinal aviaire, permettant ainsi la persistance des souches dans le tractus digestif de la volaille ([La Ragione et al., 2000](#); [Brown et al., 2001](#)). La régulation de l'opéron dépend des gènes *csgD*, *mlrA* et *rpoS* ([Brown et al., 2001](#)).

2.3.5 L'aérobactine

L'aérobactine est un sidérophore présent chez la plupart des souches APEC et contribue à leur virulence. L'aérobactine est aussi présente chez les UPEC et ce système a été détaillé dans la section traitant des facteurs de virulence des UPEC ([section 2.2.1.3](#)).

2.3.6 L'antigène capsulaire K

La capsule, codé par les gènes *kps* et absente chez les souches d'*E. coli* non pathogènes K-12, protège la bactérie contre la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte tout en étant faiblement immunogène ([Dho-Moulin et Fairbrother, 1999](#)). La capsule K1 offre une résistance à la phagocytose, augmente la résistance aux protéines du complément retrouvées dans le sérum et permet une meilleure colonisation des organes cibles de la volaille ([Mellata et al., 2003b](#); [Mellata et al., 2003c](#)). L'antigène capsulaire K1 est associé avec les sérogroupes O1 et O2 et l'antigène capsulaire K80 est associé avec le séro groupe O78 ([Gyles, 1994](#)).

2.3.7 L'hémagglutinine thermosensible Tsh

Le produit du gène *tsh*, hémagglutinine thermosensible, est un autotransporteur découvert chez la souche APEC χ 7122, mais qui est présent non seulement chez les APEC, mais aussi chez plusieurs souches d'*E. coli* pathogènes ([Parreira et Gyles, 2003](#)). Tsh possède trois domaines, soit un signal peptide clivable qui permet la translocation du cytoplasme au périplasme par un système de sécrétion de type V, un domaine passager et un β -domaine en position C-terminal ([Kostakioti et Stathopoulos, 2004](#)). Ce dernier s'insère dans la membrane externe et permet la translocation du domaine passager au milieu extracellulaire. Celui-ci reste lié à la membrane temporairement pour aider à l'adhérence lors de l'infection, avant d'être clivé et relâché dans le milieu extracellulaire ([Kostakioti et Stathopoulos, 2004](#)). Cette hémagglutinine purifiée peut lier les érythrocytes, l'hémoglobine, la fibronectine et le collagène IV, tandis qu'une souche non pathogène possédant le gène peut agglutiner les érythrocytes de poulet ([Kostakioti et Stathopoulos, 2004](#)). Il est intéressant à noter que Tsh est identique à Hbp, pouvant dégrader l'hémoglobine humaine, lier l'hème et est important pour la formation d'abcès chez la souris ([Otto et al., 2002](#)). Généralement, les hémagglutinines sont exprimés à 37°C, mais ce n'est pas le cas pour Tsh. Chez la souche sauvage χ 7122, la synthèse de Tsh est augmentée à 42°C, comparé au niveau d'expression à 26°C, mais l'activité d'hémagglutination est optimale à 26°C ([Provence et Curtiss, 1994](#); [Dozois et al., 2000](#)). Lorsque Tsh est exprimé chez *E. coli* K-12, l'expression et l'activité d'hémagglutination est optimales à 26°C, mais diminuent à 37°C et sont inhibées à 42°C ([Provence et Curtiss, 1994](#)). Les différences observées entre les deux souches peuvent être expliquées par une différence de régulation puisque la souche K-12 ne possède pas nécessairement les régulateurs des facteurs de virulence, mais aussi par la présence d'autres hémagglutinines chez χ 7122, puisqu'une délétion de Tsh n'abolit pas le phénotype d'agglutination ([Stathopoulos et al., 1999](#); [Brown et al., 2001](#)). Le gène *tsh* est présent chez 91% des souches APEC très virulentes et celui-ci contribue au développement des lésions des sacs aériens, mais n'est pas requis pour causer une infection systémique ([Dozois et al., 2000](#)).

2.3.8 L'autotransporteur Vat

Vat, une toxine autosécritée exprimée par les souches APEC et ayant 75% d'homologie à Tsh, est responsable de la formation de vacuoles cytoplasmiques chez des fibroblastes embryonniques de poussins (CEF – chick embryonic fibroblasts) ([Parreira et Gyles, 2003](#)). En absence de Vat, les souches ne sont pas virulentes lorsqu'elles sont testées dans le modèle d'infections respiratoires chez le poulet ([Parreira et Gyles, 2003](#)). Cet autotransporteur est aussi présent chez 63% des souches UPEC et 33% des souches fécales ([Heimer et al., 2004](#)).

2.3.9 La survie et la résistance aux macrophages

Tel que mentionné précédemment, les fimbriae de type P, l'antigène O78 et la capsule K1 réduisent le taux de phagocytose, mais une fois la bactérie phagocytée, les fimbriae de type 1, de type P et l'antigène O78 protègent la bactérie de l'effet bactéricide des macrophages. Ces facteurs de virulence permettent la survie des bactéries à l'intérieur des macrophages en entraînant une régulation négative des fonctions antimicrobiennes des macrophages, mais le mécanisme exact n'est pas connu ([Mellata et al., 2003a](#)).

En conclusion, les facteurs de virulence communs aux UPEC et APEC sont les fimbriae de type 1, de type P et curli, la production d'aérobactine et la présence d'une capsule. Les souches pathogènes d'*E. coli* de certains sérogroupes O1 et O2 sont associées aux infections urinaires chez les humains, causées par des UPEC, et également aux infections aviaires, causées par des APEC ([Belanger et al., 2011](#)). Il est donc possible, dans certains cas, que la volaille serve de réservoir de souches d'*E. coli* ayant le potentiel de causer des infections systémiques chez les humains, tels que les infections urinaires et les cas de méningite chez les nouveau-nés ([Belanger et al., 2011](#)).

3 Les toxines RTX

Les toxines RTX (« repeat in toxins ») sont produites par une gamme de bactéries Gram négatifs et possèdent deux caractéristiques communes, soit la présence de répétitions riches en glycine et aspartate et la sécrétion via un système de sécrétion de type 1 (SST1) (transporteur « ATP-Binding Cassette » (ABC)) ([Welch, 2001](#)). Les répétitions, se trouvant généralement dans l'extrémité C-terminal de la protéine, sont composées typiquement de nonapeptides et forment des sites de liaisons aux ions de calcium. Le SST1, dont la plupart des gènes se trouvent à l'intérieur même du locus *rtx*, reconnaît un signal non clivable à l'extrémité C-terminal et permet la translocation de la protéine du cytoplasme au milieu extracellulaire, et ce, en une étape ([Welch, 2001](#); [Linhartova et al., 2010](#)).

La masse moléculaire des toxines RTX varie de 30 kDa à plus de 600 kDa. Une des premières activités détectées est une activité hémolytique et non cytotoxique, puisque plusieurs des toxines RTX forment un halo clair autour des colonies bactériennes lorsque la bactérie produisant cette toxine est cultivée sur gélose sang ([Linhartova et al., 2010](#); [Sasaki et al., 2011](#)). Ce groupe de toxine n'inclut pas seulement les toxines avec une activité cytotoxique. Certaines toxines RTX exhibent plutôt une activité protéolytique ou lipolytique. Ces protéases ou lipases sécrétées par la bactérie agissent en synergie avec divers autres facteurs de virulence utilisés par la bactérie pour endommager des tissus ou éliciter la production de médiateurs inflammatoires ([Linhartova et al., 2010](#)). D'autres toxines RTX peuvent agir comme bactériocines, peuvent contribuer à la défense d'un danger environnemental en formant une couche de surface protectrice (« S-layers ») et même jouer un rôle dans la nodulation des plantes ou la motilité des cyanobactéries. Il existe aussi les MARTX (« multifunctional autoprocessing RTX toxins »), un groupe de toxines dont la taille est supérieure à 3200 acides aminés, ou 200 kDa, et qui possèdent plusieurs activités ([Linhartova et al., 2010](#); [Satchell, 2011](#)). Un exemple de ce type de toxine est la toxine MARTX_{Vc} de *Vibrio cholerae* qui cause l'arrondissement de cellules épithéliales suite à la catalyse de « cross-linking » covalent du réseau d'actine des cellules ([Linhartova et al., 2010](#)). Le [tableau 1](#) montre les différents membres de la famille des toxines RTX.

Tableau 1 : Différents membres de la famille RTX. (Stanley et al., 1998; Satchell, 2007; Linhartova et al., 2010; Frey, 2011; Bielaszewska et al., 2014; Barcena-Uribarri et al., 2015; Yagupsky, 2015)

Toxines RTX	Bactéries	Masse moléculaire du produit du gène <i>rtxA</i> (kDa)	Type de cytotoxicité cellulaire et spécificité de l'hôte
ApxI	<i>Actinobacillus suis</i>	110	Lymphocytes et érythrocytes équins et porcins
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	110	Spectre large
ApxII	<i>Actinobacillus suis</i>	102.5	Lymphocytes et érythrocytes équins et porcins
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	102.5	Leucocytes bovins, faible activité hémolytique
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	120	Leucocytes porcins
ApxIVA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	200	Faible activité hémolytique
EhxA	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	107	Érythrocytes humains et bovins, leucocytes bovins
HlyA	<i>Escherichia coli</i> uropathogène	110	Spectre large
LktA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	102	Leucocytes et plaquettes bovins, faible activité hémolytique
LtxA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	114	Leucocytes humains et primates
MARTX _{Vc}	<i>Vibrio cholerae</i>	484	Fibroblastes rénales de singes et cellules épithéliales du larynx humaines
MARTX _{Vv}	<i>Vibrio vulnificans</i>	550	Cellules épithéliales intestinales humaines
MbxA	<i>Moraxella bovis</i>	99	Érythrocytes bovins et leucocytes
MmxA	<i>Morganella morganii</i>	110	Érythrocytes
RtxA	<i>Kingella kingae</i>	100	Cellules épithéliales, synovial et leucocytes

Le SST1 dépend de trois protéines, soit une protéine de la membrane interne avec un domaine ATPase cytoplasmique agissant comme un exportateur ABC, une protéine de fusion membranaire (MFP) et une protéine de la membrane externe. Le système de type 1 est représenté par la [figure 4](#). Les gènes *B* et *D* de l'opéron des toxines RTX codent pour le transporteur de type ABC et pour la protéine de fusion membranaire respectivement. La RTX HlyA d'*E. coli*, comme plusieurs autres toxines de ce groupe, nécessite que la protéine multifonctionnelle ToIC, codée en dehors du locus de la toxine, prenne le rôle de protéine de la membrane externe ([Linhartova et al., 2010](#)). Cependant, certaines espèces bactériennes possèdent un homologue de ToIC dans le locus même, tel que le gène *cyaE* de *B. pertussis*. La MARTX chez *Vibrio* contient le gène *rtxE* qui code pour une deuxième protéine avec un transporteur ABC, et RtxB et RtxE sont toutes les deux requises lors de l'export de RtxA ([Boardman et Satchell, 2004](#)). L'arrangement génétique est représenté dans la [figure 5](#), où le gène *A* code pour la toxine et le gène *C* code pour l'acyltransférase nécessaire à l'activation de la toxine ([Linhartova et al., 2010](#)).

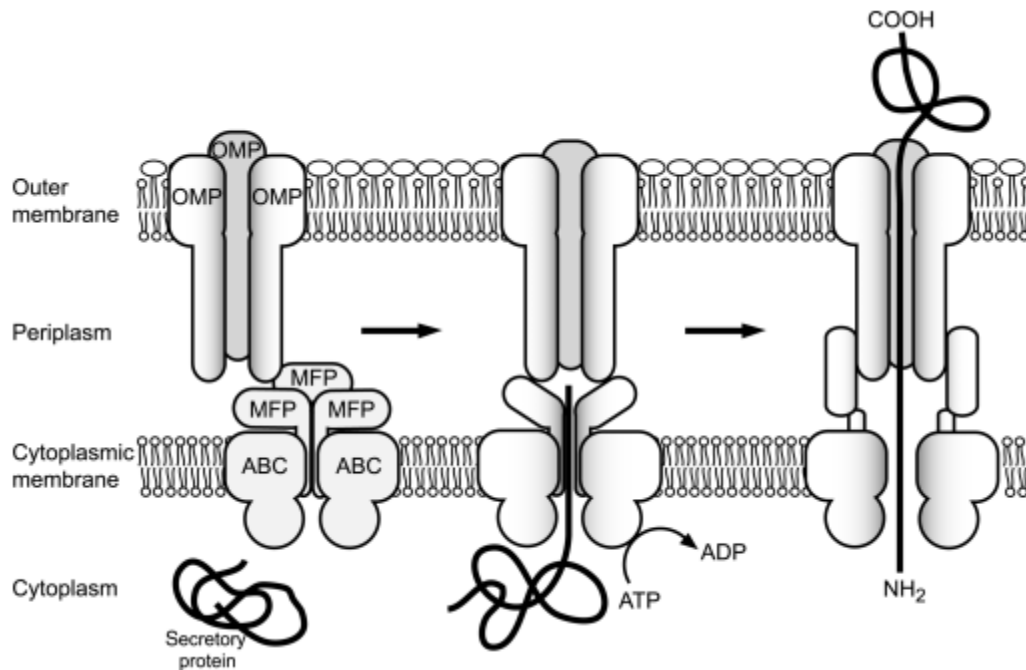


Figure 4 : Schéma de l'export d'une protéine par le système de sécrétion de type 1 ([Linhartova et al., 2010](#))

Légende : OMP : « outer membrane protein »; MFP : « membrane fusion protein »; ABC : transporteur avec domaine ABC (« ATP binding cassette ») pour hydrolyse de l'ATP.

La protéine avec le domaine ABC reconnaît un signal de sécrétion non clivable sur la protéine cible, permettant une liaison entre la protéine MFP et la protéine OMP, souvent TolC ou un membre de la même famille. L'hydrolyse de l'ATP permet le changement de conformation et l'export de la protéine, suivi d'un retour à l'état de repos.

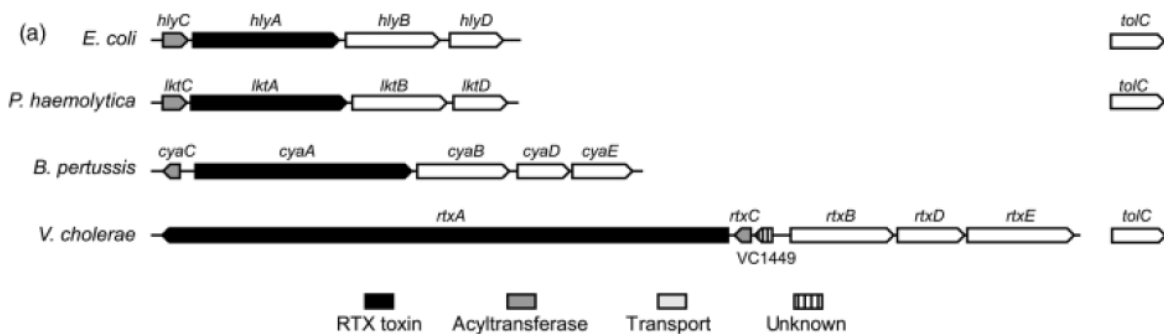


Figure 5 : Arrangement génétique des gènes du locus *rtx*. ([Linhartova et al., 2010](#))

L'export de la protéine HlyA se fait selon le modèle suivant. Un trimère d'HlyD forme un complexe avec HlyB qui lui est responsable de la reconnaissance du signal peptide en position C-terminal du substrat, soit HlyA ([Andersen et al., 2001](#)). La liaison d'HlyA à HlyB est suivie par une liaison entre HlyD et TolC, forçant un changement de

conformation qui résulte en l'export de la toxine et retour à la conformation de repos initiale ([Andersen et al., 2001](#)). L'export est dépendant de l'hydrolyse d'ATP par HlyB ainsi que de la force proton motrice de la membrane interne ([Koronakis et al., 1991](#); [Koronakis et al., 1993](#); [Koronakis et al., 1995](#)). Ceci n'est pas valide pour tous les substrats des systèmes de sécrétion de type 1, car l'hémoprotéine HasA de *Serratia marcescens* et les métalloprotéases B et C d'*Erwinia chrysanthemi* nécessitent une liaison entre la protéine ayant le domaine transporteur ABC et le substrat avant qu'il y ait liaison entre l'ABC et la protéine de fusion membranaire ([Letoffe et al., 1996](#)). Dans tous les cas, seules les protéines non repliées peuvent être exportées par le SST1 ([Young et Holland, 1999](#)).

Les cytotoxines RTX peuvent être divisées en deux familles, soit les « pore-forming leukotoxins » et les « very large MARTX ». La première famille partage les quatre caractéristiques suivantes : une acylation des résidus de lysines internes post-traductionnelle, un domaine hydrophobique qui formera un pore cation-sélectif dans la membrane de la cellule cible, export de la toxine par un SST1 et liaison d'ions de calcium aux répétitions riches en glycine et aspartate suite à la sécrétion de la toxine ([Linhartova et al., 2010](#)). Au début, la première famille était divisée en deux classes, soit hémolysine et leucotoxine, et ceci était dû à l'effet hémolytique observable sur gélose sang. De plus, les leucotoxines étaient considérées comme ayant une spécificité plus restreinte quant au type cellulaire et espèce avec lesquelles elles peuvent interagir, tandis que les hémolysines avaient un spectre plus large ([Linhartova et al., 2010](#)). Cependant, cette classification perd sa validité, car même les hémolysines à plusieurs cibles telles que HlyA et CyaA préfèrent interagir avec les récepteurs β_2 -intégrines LFA-1 et Mac-1, respectivement, des leucocytes ([Lally et al., 1997](#); [Guermontprez et al., 2001](#)). Il est donc plus précis d'affirmer que les toxines RTX formant des pores sont principalement des leucotoxines dont certaines ont une activité hémolytique ([Linhartova et al., 2010](#)). La lyse des érythrocytes et des cellules épithéliales de la vessie est grandement réduite en présence des protéines du sérum de l'hôte, mais le sérum ne peut pas empêcher la lyse des leucocytes, démontrant que la cible principale de la toxine est les leucocytes ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). Les leucocytes, en particulier les neutrophiles, sont les premières cellules recrutées au site d'infection, ce qui force le

pathogène à trouver un moyen de bloquer cette défense de l'hôte ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). De plus, des études chez le poisson-zèbre montrent que la virulence des UPEC est très atténuée suite à la délétion de la toxine HlyA, tandis que l'ablation des neutrophiles et macrophages chez le poisson permet aux UPEC $\Delta hlyA$ de récupérer leur virulence ([Wiles et Mulvey, 2013](#)).

Une toxine RTX est d'abord synthétisée sous forme de protoxine inactive nécessitant une acylation de résidus lysines conservés par une liaison covalente de résidus d'acyle gras amide. HlyC, l'acétyltransférase de HlyA, est dépendante d'acyl-ACP (acyl carrier protein) qui transmettra un groupement acyle à HlyC, le lien covalent entre ces deux formant l'intermédiaire acyl-HlyC qui à son tour transférera l'acyle gras à une lysine en position 564 (Lys⁵⁶⁴) et 690 (Lys⁶⁹⁰) de proHlyA ([Worsham et al., 2001](#); [Worsham et al., 2005](#)). Les acyles gras palmitique (C16 :0) et palmitoleique (C16 :1) les plus souvent utilisés chez *E. coli* servent de substrat à HlyC *in vitro*, mais *in vivo*, HlyC est hautement sélective pour l'acyle gras myristique (C14 :0) qui constitue 68% des acyles gras liée à Lys⁵⁶⁴ et Lys⁶⁹⁰ ([Trent et al., 1998](#)). Le 32% restant est constitué des acyles gras rares C15 :0 et C17 :0 ([Lim et al., 2000](#)). La raison d'utilisation des acyles gras impairs ainsi que le mécanisme de sélection d'acyle gras par HlyC sont encore inconnus ([Linhartova et al., 2010](#)). Dans la nomenclature des acides gras, le chiffre qui suit le C représente le nombre de carbones et le chiffre qui suit les deux points représente le nombre de liens doubles entre deux atomes de carbones. Donc l'acyle gras myristique (C14 :0) contient 14 atomes de carbones et 0 lien double entre deux atomes de carbones tandis que l'acyle gras palmitoleique (C16 :1) contient 16 carbones et 1 lien double entre deux atomes de carbone.

Le nombre de résidus acylés dépend de la souche produisant la toxine. La toxine CyaA de *Bordetella pertussis* est seulement acylée au résidu Lys⁹⁸³, mais des études d'expression chez *E. coli* ont permis de démontrer un deuxième site potentiel d'acylation, soit Lys⁸⁶⁰ ([Hackett et al., 1995](#)). Lorsque CyaA acylé par CyaC est exprimé chez *E. coli*, la toxine est acylée aux deux résidus lysines mentionnées, effet aussi observable avec CyaA provenant d'une autre souche de *B. pertussis*, 18323/pBN ([Hackett et al., 1995](#)). Toutefois, CyaA exprimé chez *E. coli* est modifié majoritairement

par l'acyle gras palmitoleique, contrairement à *B. pertussis* qui utilise exclusivement l'acyle gras palmityle. Cette différence expliquerait une diminution de la spécificité de l'activité hémolytique de la protéine exprimée chez *E. coli* puisque celle exprimée chez la souche 18323/pBN maintient le même niveau d'activité que CyaA monoacylé ([Havlicek et al., 2001](#)). Le niveau d'invasion cellulaire de CyaA exprimé chez *E. coli* était identique à la toxine provenant de la souche sauvage ([Hackett et al., 1995](#)). L'acylation à Lys⁸⁶⁰ ou Lys⁹⁸³ permettait de maintenir le même niveau de liaison au récepteur CD11b/CD18, mais un mutant pour la Lys⁹⁸³ acylée à Lys⁸⁶⁰ avait 20% de l'activité cytotoxique envers les monocytes exprimant CD11b/CD18 comparé à CyaA muté pour Lys⁸⁶⁰ acylée à Lys⁹⁸³ ([Masin et al., 2005](#)). L'acylation à Lys⁹⁸³ reste importante pour maintenir une activité cytotoxique envers des cellules cibles n'exprimant pas CD11b/CD18 ([Basar et al., 2001](#)). L'effet de l'acylation sur le mécanisme d'action des toxines n'est pas connu, seulement qu'il est important pour toute activité cytotoxique. ProHlyA et proCyaA peuvent former des pores dans des bicouches lipidiques planaires dont les propriétés sont similaires aux pores d'une toxine ([Masin et al., 2005](#)). Ces mêmes protoxines peuvent pénétrer la membrane d'un liposome, ce qui suggère que l'acylation n'est pas essentielle à la pénétration de la membrane ([Masin et al., 2004](#)).

La liaison de HlyA à un récepteur non protéique se fait en deux étapes. En premier lieu, il y a adsorption réversible de la toxine et en deuxième lieu il y a insertion irréversible dans la membrane ([Ostolaza et al., 1997](#)). HlyA, tout comme CyaA et LtxA, a une faible activité lectine et reconnaît et lie des oligosaccharides sur les récepteurs, ce qui porte à penser que la première interaction insaturable entre la toxine et sa cellule cible se fait par la reconnaissance de composantes membranaires glycosylées telle que les glycoprotéines et les gangliosides ([Morova et al., 2008](#)). Il est intéressant à noter que des études par Bauer et Welch ont montré une limite maximale de 4000 sites de liaison de HlyA sur les érythrocytes, tandis que Eberspächer n'a pas pu observer une saturabilité de la liaison de HlyA, suggérant plutôt que la liaison est indépendante d'un récepteur ([Eberspacher et al., 1989](#); [Bauer et Welch, 1996a](#)). Toutefois, la liaison de HlyA aux érythrocytes peut être bloquée en incubant avec un anticorps liant la

glycophorine, un récepteur membranaire hautement glycosylé retrouvé à la surface des globules rouges ([Eberspacher et al., 1989](#)).

Une fois inséré dans la membrane, HlyA subit un changement de conformation irréversible ([Moayeri et Welch, 1997](#)). Peu est connu sur le mécanisme d'insertion dans la membrane et la formation de pore, sauf que le domaine hydrophobique du côté N-terminal est très important pour la formation du pore ([Linhartova et al., 2010](#)). Le pore est sélectif aux cations et possède une durée de vie très courte, seulement de quelques secondes, et ces pores peuvent s'agréger ensemble pour former de grandes lésions dans la membrane cellulaire lorsque la concentration de toxine est élevée ([Linhartova et al., 2010](#)).

Il n'est toujours pas clair si la formation de pore nécessite l'oligomérisation des toxines. D'un côté, seuls des monomères d'HlyA ont été récupérés des membranes ([Linhartova et al., 2010](#)). De l'autre côté, l'activité lytique de la toxine est fonction de la concentration de toxine, suggérant que l'oligomérisation est requise pour obtenir une activité lytique ([Linhartova et al., 2010](#)). De plus, des mutants incapables de former des oligomères ne causaient pas de lyse *in vitro* et une complémentation a permis de rétablir l'effet cytotoxique des toxines ([Linhartova et al., 2010](#)). Il est toujours possible que les oligomères de HlyA se dissocient dans le détergent ([Herlax et al., 2009](#)). Récemment, des oligomères instables de CyaA ont été récupérés de la membrane des érythrocytes ([Vojtova-Vodolanova et al., 2009](#)).

La concentration cytosolique de calcium est régulée de façon stricte par les cellules et sa modulation fait partie de plusieurs procédés cellulaires. HlyA, CyaA, LtxA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et LktA de *Mannheimia haemolytica* cause un influx de calcium dans la cellule cible suite à leur liaison menant à la mort cellulaire, mais le mécanisme par lequel celui-ci se produit est encore controversé. Des doses sublytiques de HlyA activent des canaux tensiodépendant de calcium de type L suivit de l'activation des récepteurs IP3 des cellules du réticulum endoplasmique causant le relâchement du calcium intracellulaire. Cependant, d'autres concentrations de HlyA sur diverses lignées cellulaires montrent que l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire se fait par un influx passif de calcium à travers le pore générer par la

toxine ([Valeva et al., 2005](#); [Koschinski et al., 2006](#)). LktA cause une augmentation de calcium cytosolique dans les macrophages alvéolaires et les neutrophiles bovins en causant la relâche de calcium du réticulum endoplasmique et en activant des canaux de calcium, permettant ainsi au calcium extracellulaire d'entrer dans la cellule ([Cudd et al., 2003](#)). Ces résultats contradictoires peuvent en partie être expliqués par la rétroaction positive qui a lieu suite à la perméabilisation de la membrane. La liaison de HlyA cause le relâchement d'ATP dans le milieu extracellulaire qui activera des récepteurs purinergiques et des canaux pannexine perméable aux ions de calcium et contribue à la lyse cellulaire ([Skals et al., 2009](#)).

3.1 Les « hémolysines » RTX

Les hémolysines RTX sont produites par les pathogènes Gram négatifs et par les bactéries commensales respiratoires, gastro-intestinales, tractus reproductif et cavité orale des humains et animaux. *In vivo*, ces toxines induisent la production de médiateurs inflammatoires et ont un effet cytotoxique et cytolytique sur les cellules cibles menant à de l'inflammation, l'apoptose ou la nécrose.

3.1.1 HlyA

HlyA est une protéine de 110 kDa dépourvue de cystéines sécrétée par les *E. coli* uropathogènes et certaines souches d'*E. coli* commensales fécales ([Linhartova et al., 2010](#)). Il y a 200 acides aminés hydrophobes à l'extrémité N-terminale qui forment des hélices alpha amphipathique. L'extrémité C-terminal contient plusieurs sites de liaison au calcium, 11 à 17 nonapeptides riche en glycine et aspartate, le nombre variant selon la stringence de la séquence consensus, et ces nonapeptides forment des feuillets bêta ([Sanchez-Magraner et al., 2007](#)). Le domaine hydrophobe à l'extrémité N-terminale est reconnu comme étant la partie interagissant avec la membrane de la cellule cible, mais des études récentes suggèrent que les deux domaines mentionnés sont importants pour la liaison ([Sanchez-Magraner et al., 2007](#)). La [figure 6](#) est un résumé des domaines de la toxine HlyA.

Les souches UPEC vont lier les cellules épithéliales de vessie (urothéliales) et les envahir, et ces bactéries seront expulsées ou pourront entrer dans le cytoplasme et se répliquer, formant des communautés bactériennes intracellulaires (IBC) ([Mulvey et al., 1998](#); [Andersen et al., 2001](#); [Song et al., 2009](#)). La maturation de l'IBC prend environ 12 à 16 heures, suite auxquelles les bactéries retourneront au lumen et envahirons d'autres cellules urothéliales et le cycle de l'IBC peut recommencer ([Justice et al., 2004](#)). L'exfoliation de l'urothélium peut aider à éliminer l'infection, mais peut aussi permettre la dissémination des pathogènes dans les couches plus profondes de l'urothélium et causer la formation de réservoirs intracellulaires quiescents (QIR) responsables de la récurrence des infections urinaires ([Mulvey et al., 2000](#); [Mulvey et](#)

[al., 2001](#)). HlyA est capable de dégrader rapidement la paxilline et d'autres protéines de l'hôte responsable des interactions cellules-cellules et cellules-matrice, favorisant donc l'exfoliation ([Dhakal et Mulvey, 2012](#)).

Le système à deux composantes CpxR/CpxA régule négativement HlyA, en causant la répression du gène suite à la liaison du promoteur ([Nagamatsu et al., 2015](#)). La production de la toxine HlyA est augmentée chez un mutant pour le gène *cpxR*, mais la survie du mutant dans la vessie est diminuée, et donc sa virulence aussi ([Nagamatsu et al., 2015](#)). HlyA cause la mort cellulaire de l'urothélium via la pyroptose en activant les caspases 1 et 4 ([Nagamatsu et al., 2015](#)). Cette activation cause la sécrétion de médiateurs inflammatoires, augmentant l'exfoliation des cellules et l'expulsion des bactéries, ce qui diminue la virulence si HlyA n'est pas réprimée ([Nagamatsu et al., 2015](#)). Une surexpression de la toxine réduit aussi les cas de récurrence, ce qui est dû à l'exfoliation extensive des cellules urothéliales résultant en un nombre de bactéries survivantes trop faible pour permettre la persistance ([Nagamatsu et al., 2015](#)).

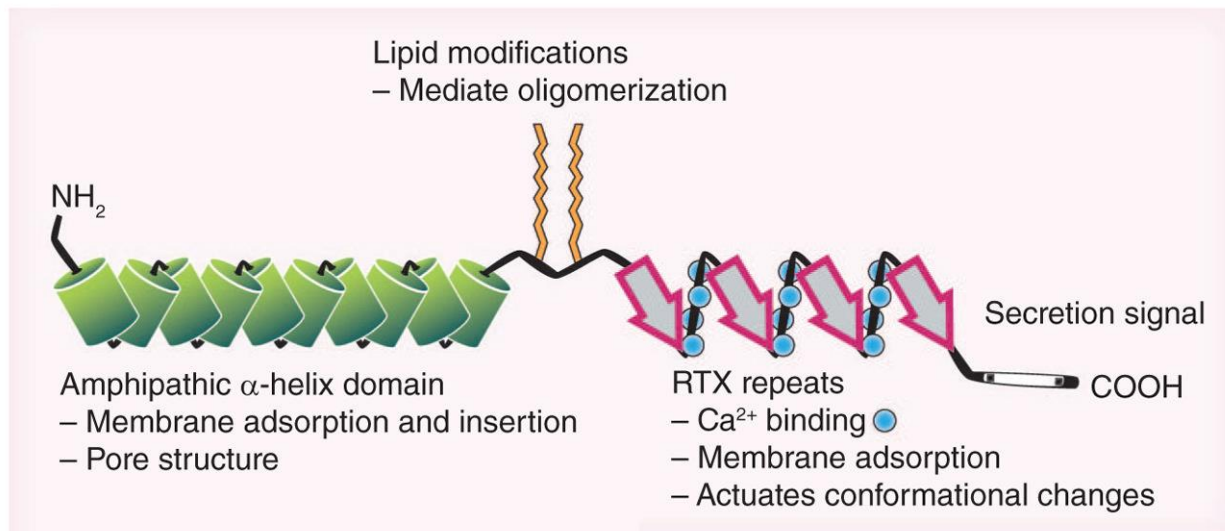


Figure 6 : Résumé des différents domaines de la toxine RTX HlyA et de leurs fonctions ([Wiles et Mulvey, 2013](#))

3.1.2 EhxA

La toxine RTX EhxA (EHEC-HlyA) de 107 kDa est codée par l'opéron *ehxCABD* se trouvant sur le plasmide de virulence pO157 de la souche EHEC O157 :H7 et les quatre gènes possèdent une homologie entre 61% et 69% à l'opéron *hlyCABD* ([Bielaszewska et al., 2014](#)). EhxA est aussi trouvé chez d'autres EHEC d'un sérotype moins prévalent, mais pas chez les autres pathotypes ([Ludwig et al., 2004](#)). L'opéron *ehxCABD* est présent chez la majorité des souches EHEC et il est sous une forte pression sélective, et semblerait donc important pour la colonisation et/ou la pathogénèse ([Li et al., 2008a](#)). En effet, les régions contenant le site actif de la toxine EhxA, les répétitions riches en glycines et aspartates, les deux lysines qui sont acylées et l'extrémité C-terminal nécessaire pour la sécrétion sont très conservées parmi une quarantaine de sérotypes STEC ([Boerlin et al., 1998](#)). La région N-terminale est assez conservée, avec un taux de substitutions de 1.3% ([Boerlin et al., 1998](#)). Les deux régions les moins conservées se retrouvent au centre de la toxine et vers l'extrémité C-terminale, où la région entre les acides aminés 312 et 660 à un taux de substitution de 5.7%, tandis que la région entre les acides aminés 835 et 948 a un taux de substitution de 7% ([Boerlin et al., 1998](#)). Les gènes *ehxC*, *ehxB* et *ehxD* sont hautement conservés ([Boerlin et al., 1998](#)).

L'organisation génomique ainsi que le rôle des quatre gènes sont conservés entre *ehxCABD* et *hlyCABD*. De plus, EhxA possède 13 répétitions riches en glycine et aspartate et, tout comme HlyA, elle possède une région hydrophobe en N-terminal responsable de l'insertion membranaire et la formation du pore et contient un signal peptide non clivable à l'extrémité C-terminal pour la sécrétion par le système de sécrétion de type 1 ([Wiles et Mulvey, 2013](#); [Bielaszewska et al., 2014](#)). Les lysines en position 550 et 675 sont les cibles d'acylation par le produit du gène *ehxC* ([Bielaszewska et al., 2014](#)). Tout comme chez HlyA, les histidines en position 841 et 845 sont nécessaires pour l'activité hémolytique puisqu'elles vont lier le calcium une fois sécrété et permettre à la toxine d'adopter sa conformation active ([Cortajarena et al., 2002](#); [Cortajarena et al., 2003](#); [Bielaszewska et al., 2014](#)). La sécrétion de la toxine est démontrée dans la [figure 7](#).

Les régulateurs GrIR et GrIA codés dans le locus of enterocyte effacement (LEE) sont responsables de la transcription de l'opéron *ehxCABD*, où GrIR régule négativement et GrIA régule positivement la synthèse de la toxine ([Saitoh et al., 2008](#)). En fait, GrIR est un facteur anti-GrIA puisqu'il interagit avec GrIA pour inhiber la fonction de ce dernier ([Iyoda et al., 2011](#)). De plus, les régulateurs Ler et LrhA affectent positivement l'expression de l'opéron, et ce, indépendamment l'un de l'autre et de GrIA ([Iyoda et al., 2011](#)). H-NS régule négativement la synthèse de l'opéron d'une façon dépendante de la température, et H-NS est plutôt exprimé à de basses températures, tout comme chez HlyA ([Li et al., 2008a](#)). À 30 °C, la protéine DsrA réprime H-NS et permet une augmentation de l'expression d'EhxA, mais à 37°C, DsrA cause aussi une augmentation de l'expression d'EhxA, cependant d'une façon indépendante de H-NS et aurait donc deux mécanismes de régulation ([Li et al., 2008a](#)). Finalement, le facteur σ RpoS est primordial pour l'expression d'EhxA, car en son absence, il n'y a aucune expression de l'opéron *ehxCABD*, et ce, malgré la présence des autres régulateurs positifs ([Li et al., 2008a](#)). Tout comme HlyA, EhxA est réprimée lorsque la température est faible ou lorsque l'osmolarité est élevée. Les deux toxines sont sous le contrôle du répresseur du produit du gène *hha*, car un mutant *hha* exprime HlyA ou EhxA à de faibles températures ou à des osmolarités élevées ([Nieto et al., 1997](#); [Iyoda et al., 2011](#)).

Il n'est pas encore clair si EhxA nécessite une oligomérisation pour son activité cytolytique ([Bielaszewska et al., 2014](#)).

EhxA lyse les érythrocytes humains et ovins, mais lyse seulement les lymphocytes bovins. Cependant, EhxA possède 100 fois moins d'affinité et une activité spécifique 40 fois plus faible pour les érythrocytes que la toxine HlyA ([Bielaszewska et al., 2014](#)). EhxA produit une zone d'hémolyse sur gélose sang seulement après une incubation de 18 heures, tandis que HlyA produit une zone d'hémolyse sur une gélose sang après environ 4 heures ([Bielaszewska et al., 2014](#)). Ce qui permet d'identifier les souches produisant cette toxine est la présence d'une zone d'hémolyse turbide étroite autour des colonies isolées sur gélose sang contenant du Ca^{2+} , mais pas sur gélose sang standard, et ce, après une incubation de 18 heures ([Bielaszewska et al., 2014](#)).

Toutefois, EhxA est capable de lyser les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain (HBMEC), indiquant que cette toxine serait capable d'endommager des cellules endothéliales, et pourrait avoir un rôle potentiel dans les dommages microvasculaires du syndrome hémolytique urémique ([Aldick et al., 2007](#); [Bielaszewska et al., 2014](#)). EhxA possède un effet cytotoxique envers les cellules endothéliales intestinales Caco-2 et des cellules endothéliales microvasculaires tel que GMVEC ([Bielaszewska et al., 2009](#); [Bielaszewska et al., 2013](#)).

EhxA possède une forte affinité pour les vésicules de la membrane externe (OMV) sécrétée par *E. coli* O157:H7 et s'associe avec ces vésicules suite à sa sécrétion par le SST1 ([Bielaszewska et al., 2013](#)). En phase exponentielle, plus de 70% des toxines sont associées aux OMV, et ce pourcentage augmente à plus de 80% en phase stationnaire ([Bielaszewska et al., 2013](#)). L'association avec une OMV se fait indépendamment de l'acylation de la toxine ([Aldick et al., 2009](#)). La liaison des toxines associées aux OMV est retardée, où la lyse se fait après 15 heures au lieu de 30 minutes lorsqu'on regarde la forme libre d'EhxA, mais l'OMV permet de stabiliser la toxine et elle maintient son activité hémolytique jusqu'à 80 fois plus longtemps que la forme libre ([Aldick et al., 2009](#)).

Les toxines associées aux OMV sont internalisées par endocytose par les cellules HBMEC et Caco-2, et, une fois dissociée de l'OMV par l'acidification du lysosome, EhxA s'échappe du lysosome, probablement en formant des pores dans celui-ci augmentant son pH, et se retrouve dans la mitochondrie grâce à un signal de transport mitochondrial, où il causera le relâchement du cytochrome c et activation de la caspase-9 qui engendra les mécanismes d'apoptose des cellules ([Bielaszewska et al., 2013](#)). Ce processus est démontré dans la [figure 8](#).

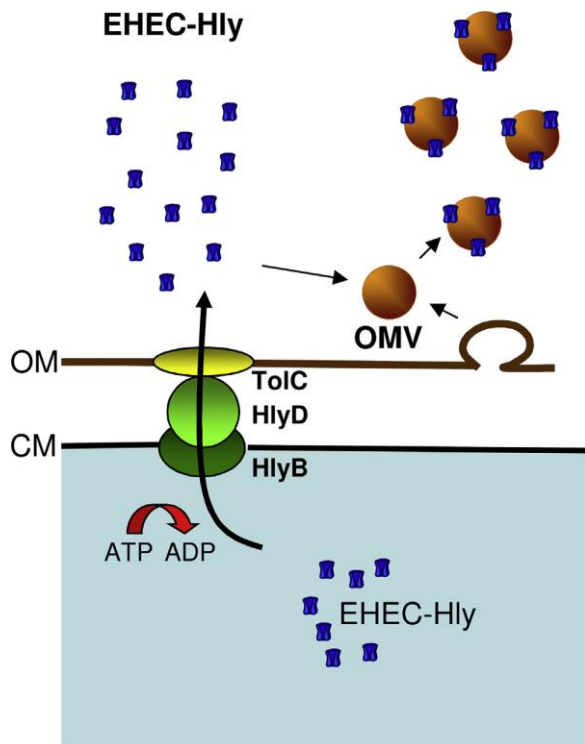


Figure 7 : Sécrétion et association de EhxA (EHEC-HlyA) avec les OMV. ([Bielaszewska et al., 2014](#))

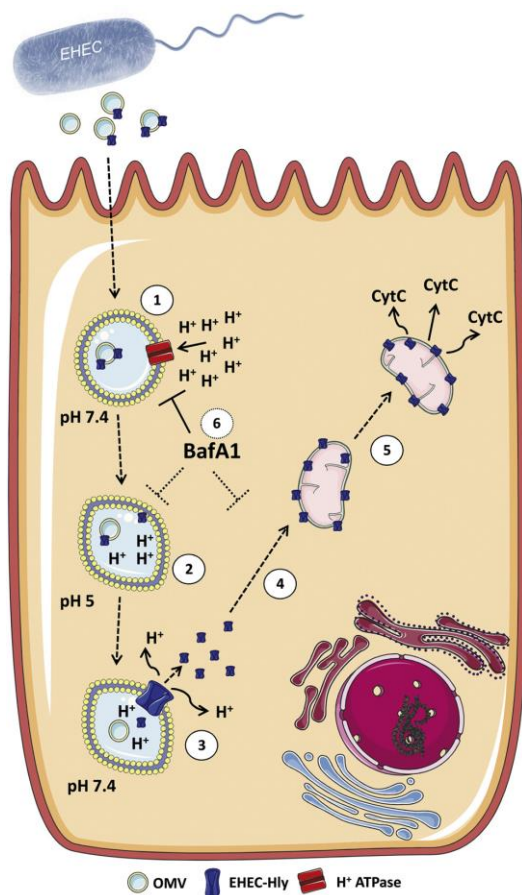


Figure 8 : Endocytose de la toxine EhxA et l'induction de l'apoptose par celle-ci. ([Bielaszewska et al., 2013](#))

3.1.3 Les toxines Rtx de la famille Pasteurellaceae

La plupart des membres de la famille Pasteurellaceae sont des souches commensales des animaux vertébrés et colonisent les voies respiratoires supérieures, l'oropharynx, le tractus reproductif et le tractus digestif ([Kuhnert et al., 2010](#)). Certaines espèces sont des pathogènes opportunistes causant des infections des voies respiratoires et génitales et certaines espèces sont des pathogènes tant pour les humains que les animaux ([Frey, 2011](#)). La famille Pasteurellaceae possède plusieurs espèces sécrétant des toxines RTX tel que les toxines ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA, ApxIVA du genre *Actinobacillus*, AqxA d'*Actinobacillus equuli*, ou PaxA de *Pasteurella aerogenes* ([Frey et Kuhnert, 2002](#)). Des analyses génétiques montrent que les toxines RTX proviennent originellement de la famille Pasteurellaceae et elles se sont

répandues vers d'autres bactéries Gram négatif via un transfert de gène horizontal ([Linhartova et al., 2010](#)).

3.1.3.1 Apx

Actinobacillus pleuropneumoniae cause des infections pulmonaires sévères chez les porcs ([Frey, 2011](#)). Quatre toxines RTX ont été retrouvées parmi les différentes souches d'*A. pleuropneumoniae*, nommées ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV ([Frey, 2011](#)). ApxI est fortement hémolytique et cytotoxique, ApxII est faiblement hémolytique et cytotoxique, ApxIII est non hémolytique, mais fortement cytotoxique et ApxIV est faiblement hémolytique ([Frey et Kuhnert, 2002](#); [Frey, 2011](#)). La sécrétion des toxines dépend du sérotype des souches. Les souches très pathogènes du sérotype 1, 5, 9 et 11 sécrètent ApxI, ApxII et ApxIV, les souches peu pathogènes du sérotype 2, 4, 6, 8 et 15 sécrètent ApxII, ApxIII et ApxIV, et les autres sérotypes sécrètent une des trois premières Apx en plus d'ApxIV ([Frey, 2011](#)). Plus spécifiquement, les sérotypes 1, 5, 9, 10, 11 et 14 expriment ApxI, tous les sérotypes sauf 10 et 14 expriment ApxII et les sérotypes 2, 3, 4, 6, 8 et 15 expriment ApxIII ([Gimenez-Lirola et al., 2014](#)). Toutes les souches sécrètent ApxIV lors des infections, mais pas in vitro dans n'importe quelles conditions testées ([Deslandes et al., 2010](#); [Frey, 2011](#)). Le locus *apxII* ne contient que les gènes *apxIIC* et *apxIIA*, et c'est le SST1 de ApxI qui est responsable de l'export d'ApxIIA, tandis que celui d'ApxIII ne peut pas exporter ApxIIA ([Kuhnert et al., 2005](#); [Kuhnert et al., 2011](#)). L'espèce *A. porcitonisillarum* possède l'opéron *apxIICABD* complet, avec des gènes d'exports fonctionnels, suggérant que l'opéron était autrefois fonctionnel, et des analyses génétiques suggèrent que la version tronquée retrouvée chez *A. pleuropneumoniae* proviendrait d'une recombinaison à l'intérieur de l'espèce, mais pas d'un transfert horizontal incomplet de l'opéron ([Kuhnert et al., 2005](#)). Les toxines ApxIA et ApxIIA sont aussi retrouvées chez *A. rossii* et les toxines ApxIIA et ApxIIIA sont aussi présentes chez *A. suis*, tandis que la toxine ApxIVA est spécifique à l'espèce *A. pleuropneumoniae* ([Gimenez-Lirola et al., 2014](#)). ApxIIA est nécessaire pour causer une pleuropneumonie porcine et c'est une combinaison d'ApxIA et d'ApxIIA qui détermine la sévérité de la maladie et la mort du porc. ApxIIIA et PaxA ne sont pas

hémolytiques, mais sont positives pour la réaction de CAMP. ApxIIIA est hautement cytotoxique envers les macrophages ([Frey et Kuhnert, 2002](#)). L'activité cytotoxique de PaxA n'est pas connue, mais toutes les souches virulentes isolées expriment le gène paxA, tandis que les souches n'ayant pas paxA sont soit des souches commensales ou des pathogènes opportunistes ([Frey et Kuhnert, 2002](#)).

3.1.3.2 Lkt

Mannheimia haemolytica cause des pneumonies sévères chez le bétail, le mouton et la chèvre et code pour la leucotoxine RTX Lkt ([Frey, 2011](#)). Lkt est faiblement hémolytique et semble être le facteur de virulence principal de l'espèce, et cette toxine est seulement toxique envers les leucocytes des ruminants, ce qui expliquerait la restriction de l'hôte que *M. haemolytica* est capable d'infecter ([Frey, 2011](#)). Lkt cause la lyse des leucocytes via la voie d'apoptose dépendante de la caspase-9 ([Atapattu et Czuprynski, 2005](#)).

3.1.3.3 MmxA et MbxA

Morganella morganii produit la RTX MmxA qui démontre une activité cytotoxique envers les leucocytes humains polymorphonucléaire ([Linhartova et al., 2010](#)). MbxA de *Moraxellaceae bovis* est un facteur de virulence important des infections de kératoconjonctivite bovines où elle endommage les cellules épithéliales cornéennes ([Linhartova et al., 2010](#)). L'opéron *mbxCABD* est présent seulement chez les souches hémolytiques et fait partie d'un îlot de pathogénicité mobile ([Linhartova et al., 2010](#)).

3.2 Les « leucotoxines »

Les leucotoxines peuvent seulement agir sur des types cellulaires restreints provenant d'espèces spécifiques. LktA est cytolytique seulement envers les leucocytes et plaquettes des ruminants, et LtxA se lie seulement aux lymphocytes et granulocytes d'humains, des hominidés et des cercopithécidés ([Linhartova et al., 2010](#)). Toutefois, LtxA et LktA sont hémolytiques ([Linhartova et al., 2010](#)).

3.2.1 LktA et LtxA

LktA joue un rôle dans la pneumonie bovine et ovine et LtxA est le facteur de virulence principal dans la parodontite localisée agressive chez les humains ([Fine et al., 2006](#); [Haubek et al., 2006](#)). Ces deux toxines sont aussi capables d'inhiber la motilité, le chimiotactisme, la poussée oxydative des neutrophiles, la relâche de médiateurs inflammatoires des granulocytes et des macrophages, d'empêcher la phagocytose par les cellules polymorphonucléaires et de perturber le phagosome, permettant l'invasion bactérienne du phagocyte. La synergie de ces effets réduit énormément la réponse immunitaire de l'hôte ([Balashova et al., 2007](#)). LtxA est aussi capable de réagir avec la superoxyde dismutase Cu/Zn et protège ainsi la bactérie elle-même des réactifs d'oxygène produit lors de la réponse inflammatoire de l'hôte ([Balashova et al., 2007](#)).

LtxA est homologue à 40-50% à HlyA et LktA. ProLtxA et proLktA peuvent lier une cellule cible, mais ne cause aucune augmentation de calcium et ne sont pas cytotoxique. ProLktA peut être acylé par HlyC, CyaC et LtxA ([Lally et al., 1994](#); [Westrop et al., 1997](#)).

Des neutrophiles isolés de bovins souffrant d'une déficience d'adhésion des leucocytes étaient résistants à la lyse par LktA. Cette maladie est causée par une mutation ponctuelle dans la région extracellulaire de la sous-unité CD18, ce qui réduit l'expression de l'intégrine $\beta 2$ de LFA ([Nagahata, 2004](#)). La lignée cellulaire K562 n'exprimant pas LFA-1 est résistante à LtxA, mais une transfection du gène de ce récepteur rend cette lignée sensible à l'effet cytotoxique de LtxA ([Lally et al., 1997](#)). Une

expérience similaire avec LktA démontre le même effet et que le degré de cytotoxicité corrèle avec le niveau d'expression de LFA-1 ([Leite et al., 2000](#)).

L'effet des leucotoxines est hautement dépendant de la dose à laquelle les cellules cibles sont soumises. À des concentrations sublytiques, il y a une augmentation de la concentration de calcium, activation des neutrophiles et des cellules mononuclées afin de causer une poussée oxydative, une dégranulation et relâchement de cytokines proinflammatoires et production de médiateurs lipidiques par les macrophages ([Kelk et al., 2008](#); [Balashova et al., 2009](#)). Lorsque la concentration de toxine atteint un seuil critique, les cellules cibles entrent en apoptose ([Kelk et al., 2003](#)). En haut de ce seuil, les mécanismes d'apoptose sont dépassés et l'excès de pores sur la cellule la force à entrer en nécrose.

La production de leucotoxines est augmentée en condition anaérobique et est régulée par divers stimuli environnementaux tel que la disponibilité du fer, la température, le niveau de sucre et la concentration de molécules de signalisation du système de « quorum sensing » ([Fong et al., 2001](#); [Inoue et al., 2001](#); [Marciel et Highlander, 2001](#); [Kolodrubetz et al., 2003](#); [Balashova et al., 2006](#)).

3.2.2 La toxine CyaA de *Bordetella pertussis*

La toxine CyaA est unique parmi ce groupe de toxine, car elle possède aussi, en extrémité N-terminal, un domaine fonctionnel d'adénylate cyclase (AC) qui permet l'invasion cellulaire, et ce, en plus de sa capacité à former des pores. Sa fonction plus typique d'une toxine RTX, exprimée en plus de sa fonction adénylate cyclase, requiert que ces cellules cibles expriment le récepteur MAC-1 (CD11b/CD18) et la toxine utilise son domaine AC, de plus faible efficacité, lorsque la cellule n'exprime pas ce récepteur ([Vojtova et al., 2006](#)). La plupart des AC entrent dans le cytoplasme via l'endosome, mais CyaA est capable de rentrer en passant directement à travers la membrane cytoplasmique, sans passer par une endocytose médiée par un récepteur ([Vojtova et al., 2006](#)). Une fois à l'intérieur de la cellule, le domaine AC de CyaA lie la calmoduline et convertit l'ATP en cAMP, une molécule de signalisation, empêchant ainsi la poussée oxydative et la phagocytose et induit la sécrétion de cytokines immunomodulatoires,

abolissant par le fait les fonctions bactéricides des phagocytes ([Vojtova et al., 2006](#)). La reconnaissance du récepteur MAC-1 se fait par les répétitions riches en glycine et aspartate, mais tout le domaine « RTX » de CyaA semble être important pour l'insertion et la translocation de la partie adénylate cyclase. L'énergie pour la translocation est obtenue par un potentiel négatif de la membrane. CyaA est responsable de l'induction d'IL-6 par les cellules épithéliales de la trachée. Dans le modèle d'infection pulmonaire murin, CyaA augmente l'efficacité de la colonisation, induit des lésions histopathologiques dans les poumons, recrute des leucocytes inflammatoires et cause la mort des cellules. Il a même été démontré que de faibles concentrations de CyaA peuvent inhiber l'opsonophagocytose médié par le complément ([Vojtova et al., 2006](#)). CyaA peut aussi perturber le potentiel membranaire des mitochondries, menant à l'apoptose des macrophages ([Vojtova et al., 2006](#)).

3.3 Régulation

RfaH, un régulateur positif de l'opéron *rfa*, agit comme un facteur d'antiterminaison pour les gènes *hlyB* et *hlyD*, et donc la régulation de *hlyC* et *hlyA* n'est pas couplée avec celle des gènes de transport ([Thomas et al., 2014](#)). La régulation par RfaH nécessite un terminateur rho-indépendant qui se positionne dans l'espace intergénique entre *hlyC* et *hlyB* ([Thomas et al., 2014](#)). Dans la région en aval du promoteur de l'opéron *hlyCABD*, il y a deux séquences appelées JUMPstart (« just upstream of many polysaccharide-associated starts ») et ops (« operon polarity suppressor ») qui sont reconnus par RfaH. L'ARN polymérase effectue une pause à la séquence JUMPstart, permettant d'exposer *ops* à RfaH, qui va lier cette séquence ainsi que l'ARN polymérase et permettre d'établir un complexe stable ayant un taux de transcription plus rapide et qui est plus processif sur une longue distance, permettant donc à l'ARN polymérase de continuer la transcription sans arrêt supplémentaire ([Thomas et al., 2014](#)). Sans la liaison de RfaH, l'ARN polymérase ne peut rester lier à l'ADN suite à la transcription du gène *hlyA* et débarque. La régulation par RfaH fait en sorte que les gènes de transport *hlyB* et *hlyD* sont exprimés à un niveau plus faible que

les gènes *hlyC* et *hlyA* (Thomas et al., 2014). La [figure 9](#) montre l'organisation génétique de l'opéron *hlyCABD* (Stanley et al., 1998).



Figure 9 : Organisation génétique de l'opéron *rtxCABD* ainsi que le site de liaison de RfaH, (Thomas et al., 2014)

Il existe une régulation temporelle de l'opéron, où la sécrétion de toxine a lieu tôt dans la phase exponentielle de croissance et continue jusqu'à la frontière avec la phase stationnaire, juste avant l'arrêt de croissance (Thomas et al., 2014). Les régulateurs globaux de l'organisation nucléoïde H-NS et Hha régule l'expression de l'opéron lorsque la température de l'environnement est basse. Il y aurait aussi une boucle de rétroaction négative pour l'expression du gène *hlyC*, car en absence des gènes d'export, une surproduction d'HlyA cause une réduction de l'expression du gène *hlyC* par trois fois (Thomas et al., 2014).

La régulation de l'opéron *hlyCABD* fut surtout étudiée *in vitro*, et il est présumé que l'expression a seulement lieu lors d'une infection, où l'expression est peut-être initiée par des signaux de « quorum sensing » qui augmenterait l'expression de RfaH (Thomas et al., 2014).

3.4 Les toxines MARTX

Les toxines MARTX diffèrent des autres toxines RTX par leur structure moléculaire et l'organisation de l'opéron. Ces toxines sont retrouvées chez différentes espèces de *Vibrio*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii*, *Proteus mirabilis*, *Photobacterium luminescens* et *Photobacterium asymbiotica* ([Satchell, 2007](#); [Li et al., 2008b](#)). La toxine MARTX de *Vibrio cholerae*, MARTX_{Vc}, est la plus étudiée ([Satchell, 2007](#)). Ces toxines ont une longueur variant entre 3212 et 5206 acides aminés ([Satchell, 2007](#)). L'extrémité C-terminal contient une séquence consensus de 18 acides aminés X(V/I)XXGXXNX(V/I)XXGDGDX et les répétitions de nonapeptide sont remplacées par un motif central dont la séquence est G-7X-GXXN ([Satchell, 2007](#)). L'extrémité N-terminal contient aussi des répétitions pouvant être divisées en deux classes, soit une séquence consensus de 20 résidus GXXG(N/D)(L/I)(T/S)FXGAG(A/G)XNX(L/I)X(RH) ou une séquence consensus de 19 résidus T(K/H)VGDGX(S/T)VAVMXGXAN(I/V)X ([Satchell, 2007](#)). Au total, les répétitions riches en glycine représentent 25% de la séquence totale de MARTX_{Vc} et sont responsables de la liaison à la cellule cible et facilite la translocation d'environ 1700 acides aminés centraux au cytoplasme de la cellule cible ([Satchell, 2007](#)). La partie centrale qui est transloquée dans le cytoplasme de la cellule est composée de différents domaines, selon le type de toxine ([Boardman et Satchell, 2004](#); [Satchell, 2007](#)). Cette différence de domaines qui peuvent être présents dans chaque partie centrale indique donc que l'activité et le rôle de chaque toxine diffèrent aussi.

Les gènes des MARTX sont codés sur deux opérons, *rtxHCA* et *rtxBDE*, où *rtxH* code pour une protéine dont la fonction est inconnue ([Boardman et Satchell, 2004](#)). Les autres gènes semblent coder pour des homologues, mais une différence serait le gène *rtxE* codant pour une deuxième ATPase nécessaire à la sécrétion, car l'inactivation du gène empêche la sécrétion de la toxine chez *V. vulnificans* et *V. anguillarum* et réduit leur virulence envers des cellules épithéliales ([Boardman et Satchell, 2004](#); [Lee et al., 2008](#); [Li et al., 2008b](#)). L'OMP requis pour la sécrétion, généralement TolC, mais peut être un homologue de TolC, est codé par un gène se trouvant à l'extérieur du locus *rtx* ([Boardman et Satchell, 2004](#)). Ce système de sécrétion de type 1 atypique à quatre

composantes semble être conservé chez la famille MARTX ([Boardman et Satchell, 2004](#)). Le locus de MARTX contient un gène *C* codant pour une acétyltransférase, mais celle-ci ne semble pas nécessaire pour l'activité de MARTX_{Vc}, quoique la protoxine démontre une activité réduite, et n'affecte aucunement l'activité de la MARTX de *Vibrio vulnificans* ([Lee et al., 2007](#); [Liu et al., 2007](#)). Ces résultats démontrent que l'acylation ne semble pas requise pour la fonction de toutes les MARTX.

Le SST1 de MARTX est régulé par la phase de croissance ([Boardman et al., 2007](#)). Le répresseur de l'opéron *rtxBDE* se trouve à l'extérieur du locus *rtx*, ne semble pas être relié au quorum sensing, mais *V. cholerae* régule le locus selon son degré de stress ([Boardman et al., 2007](#)).

MARTX_{Vc} se retrouve chez des isolats cliniques et environnementaux de *V. cholerae*, à l'exception du biotype O1, et contient 4545 résidus pour un poids moléculaire d'environ 485 kDa ([Chow et al., 2001](#)). Contrairement aux toxines RTX formant des pores mentionnés plus tôt, MARTX_{Vc} n'interrompt pas l'intégrité membranaire et ne lie pas les cellules cibles, mais contribue plutôt à la réponse inflammatoire aiguë causée lors du choléra en modifiant la perméabilité des jonctions serrées ([Cordero et al., 2006](#)). Ceci cause un arrondissement des cellules cibles et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine, mais n'induit pas l'apoptose ou la nécrose ([Cordero et al., 2006](#)). Les monomères d'actines sont habituellement liés par des liens covalents grâce à un « actin cross-linking domain » (ACD) qui nécessite la G-actine comme substrat et une molécule d'ATP ([Kudryashov et al., 2008](#)). La toxine MARTX_{Vc} contient un ACD entre les résidus 1963 et 2375 qui catalysera un lien isopeptide ([Kudryashov et al., 2008](#)). La délétion du domaine ACD n'empêche toutefois pas l'arrondissement des cellules, car la toxine a un deuxième mécanisme qui s'attaque à la régulation des GTPase Rho, Rac et Cdc42, soit un domaine d'inactivation Rho (RID) qui inactive par un mécanisme distinct des autres toxines bactériennes ayant le même rôle ([Sheahan et Satchell, 2007](#)). Une fois la région centrale de la toxine à l'intérieur du cytoplasme, l'ACD est relâché du reste par l'autocatalyse via un domaine cystéine protéase (CPD) conservé qui est activée par la liaison de l'acide phytique (InsP₆) qui se retrouve en grande concentration en périphérie de la membrane interne, concentration

supérieure à 10µM, et qui est unique aux cellules eucaryotes. Ce mécanisme qui assure que l'ACD sera seulement relâché une fois rendu au cytoplasme de la cellule hôte ([Lupardus et al., 2008](#)). Le CPD clive aussi le domaine RID, permettant à plusieurs domaines d'être relâché à l'intérieur de la cellule cible ([Lupardus et al., 2008](#)).

MARTX_{Vv} de *V. vulnificans* à 80-90% d'identité à MARTX_{Vc}, mais ne possède pas de ACD, et, conséquemment, est incapable de causer une dépolymérisation du réseau d'actine, mais possède le domaine RID et CPD. MARTX_{Vv} est toutefois cytolytique et très important pour la virulence de la souche ([Lee et al., 2007](#); [Liu et al., 2007](#)).

Vibrio anguillarum possède une MARTX importante pour sa virulence et une hémolysine, Vah1, est aussi présente chez la souche M93Sm ([Li et al., 2008b](#)). Vah1 cause la vacuolisation cellulaire tandis que MARTX_{Va} cause l'arrondissement cellulaire par son domaine RID seulement, puisque le domaine ACD est absent. Un simple mutant *vah1* ou *rtxA* est atténué et le double mutant n'est pas cytotoxique ([Li et al., 2008b](#)).

Photobacterium luminescens possède des MARTX se trouvant sur deux régions éloignées du chromosome où il y a quatre loci intacts des gènes *rtxA* et quatre loci interrompus par des mutations du cadre de lecture ou insertion de séquence ([Duchaud et al., 2003](#)). L'organisation des gènes est identique à celle de *V. cholerae*, mais RtxA ne possède aucun domaine ACD, suggérant que la toxine est incapable de causer la dépolymérisation du réseau d'actine de la cellule cible ([Duchaud et al., 2003](#)).

3.5 Les RTX à domaine cadhérine

Deux nouvelles toxines RTX, RtxL1 et RtxL2, ont été identifiées chez *Vibrio cholerae* N16961, mais sont aussi présentes chez toutes les souches O1, O139, et les souches non-O1-non-O139 VCE232 et VCE309, et jouent un rôle dans la virulence dans un modèle murin ([Chatterjee et al., 2008](#)). Ces deux toxines sont caractérisées par la présence de plusieurs domaines cadhérines permettant l'adhérence et la formation de biofilms, mais elles sont toutefois classées dans la famille RTX des hémolysines et leucotoxines puisqu'elles ont un effet hémolytique sur les érythrocytes humains ([Chatterjee et al., 2008](#)). Une autre toxine RTX, avec plusieurs domaines cadhérines, FrhA, fût retrouvée chez la souche O1 classique O395 et chez les souches O1 El Tor A1552 et P27459, et elle est considérée comme une hémagglutinine « RTX-like » ([Syed et al., 2009](#)). L'expression de FrhA est régulée positivement par le même mécanisme de régulation flagellaire ([Syed et al., 2009](#)). FrhA est responsable de l'adhérence aux cellules épithéliales et à la chitine, augmente la formation de biofilm et est impliqué dans la colonisation intestinale des jeunes souris ([Syed et al., 2009](#)).

3.6 Les protéases RTX

Les protéases RTX sont des métalloprotéases microbiennes dépendantes du zinc appartenant au sous-groupe metzincin métalloendopeptidases, et leur taille moyenne est de 50 kDa avec un point isoélectrique de 4.0-4.6 ([Miyoshi et Shinoda, 2000](#)). Le domaine protéolytique se trouve à l'extrémité N-terminal et les domaines de liaison au calcium se trouvent à l'extrémité C-terminal ([Miyoshi et Shinoda, 2000](#)). Ces protéases sont sécrétées sous forme de proenzyme nécessitant une activation par protéolyse post sécrétion. Ce sous-groupe contient trois histidines nécessaires à la liaison d'un ion de zinc et un acide glutamique important pour l'activité catalytique ([Miyoshi et Shinoda, 2000](#)). De plus, ce groupe contient une méthionine conservée à un point proche du site catalytique, 40 à 60 résidus de l'extrémité C-terminal ([Miyoshi et Shinoda, 2000](#)). Sous forme proenzyme, le site catalytique est caché et empêche la liaison à un ion de zinc, et différentes protéases se retrouvant dans le milieu

extracellulaire peuvent rendre le site de liaison au zinc disponible. Les protéases RTX, tout comme les autres métalloprotéases dépendante du zinc, sont inhibées par l'EDTA, un inhibiteur général de métalloprotéases, et par o-phenanthroline, un inhibiteur spécifique de métalloprotéases dépendante du zinc ([Zhang et al., 1999](#)).

Le locus de la protéase RTX de *P. aeruginosa* est composé de cinq gènes, *aprD*, *aprE* et *aprF* codant pour le système de sécrétion de type 1, *aprA* codant la protéase, et *aprI* codant pour un inhibiteur de protéase (*inh*) ([Duong et al., 1992](#)). L'organisation de ces gènes dans l'opéron est variable – une représentation se trouve dans la [figure 10](#)– et l'organisation génétique semble dépendre du nombre de protéases sécrétées. *Erwinia amylovora* sécrète une seule protéase RTX, *P. mirabilis* en sécrète deux, ZapA et ZapE, et *E. chrysanthemi* sécrète quatre protéases RTX, soit *prtG*, *prtC*, *prtB* et *prtA*. Certaines espèces bactériennes combinent l'opéron des protéases RTX à celui des lipases RTX ([Bowen et al., 2003](#)).

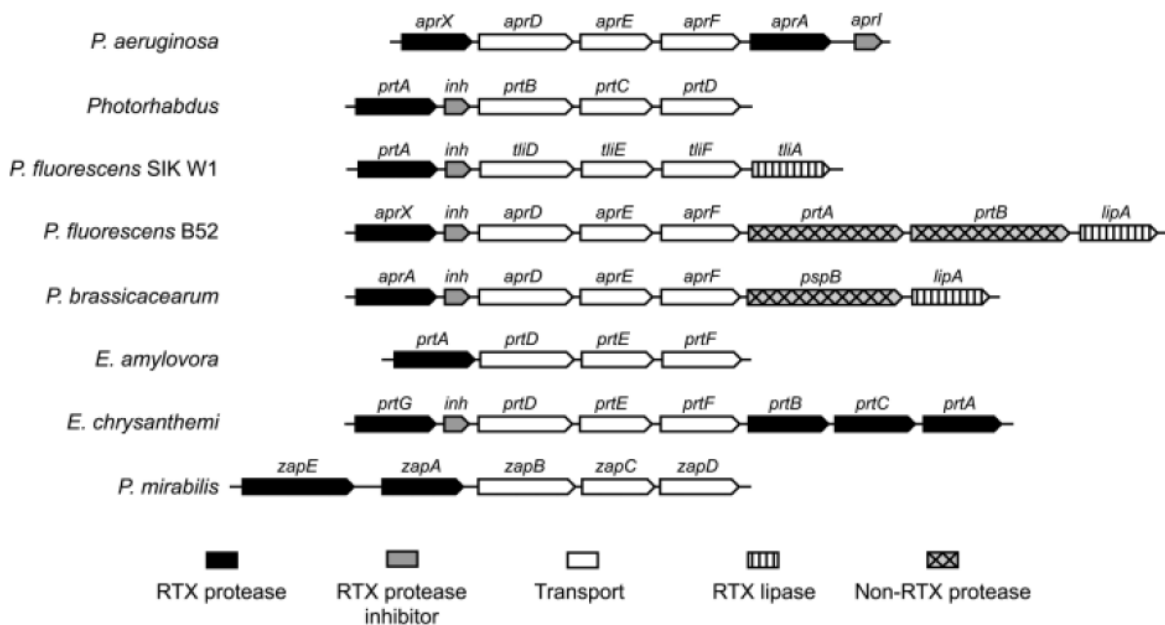


Figure 10 : Organisation génétique des protéases de la famille des protéines RTX ([Linhartova et al., 2010](#)).

L'inhibiteur de protéases d'*E. chrysanthemi*, *Inh*, est synthétisé sous forme d'un polypeptide de 12 kDa ayant un peptide signal de 19 acides aminés qui est clivé lors de l'export au périplasme par un système Sec-dépendant ([Dahler et al., 1990](#); [Ghigo et](#)

[Wandersman, 1992](#)). Inh est capable d'interagir avec des protéases RTX d'autres espèces, tandis que certains sont très spécifiques, et a comme rôle la protection des protéines du périplasme dans l'éventualité où les protéases RTX sécrétées se retrouvent au périplasme au lieu du milieu extracellulaire ([Dahler et al., 1990](#); [Ghigo et Wandersman, 1992](#)). L'inhibiteur de protéases a une forte affinité envers la protéase et se lie à celle-ci par un lien covalent irréversible, empêchant les protéases d'interagir et de cliver les protéines bactériennes ([Baumann et al., 1995](#); [Valens et al., 2002](#)).

ArpA de *P. aeruginosa* hydrolyse la fibrine, le fibrinogène et la laminine et agit comme anticoagulant ([Shibuya et al., 1991](#)). Son habilité de dégrader la laminine montre un rôle direct avec l'invasion de tissu et la nécrose tissulaire hémorragique qui survient lors d'une infection par *P. aeruginosa* ([Shibuya et al., 1991](#)). ArpA est aussi capable de dégrader C1q et C3, des composantes du complément, ce qui permettrait à la bactérie de survivre et de proliférer dans le sang ([Hong et Ghebrehiwet, 1992](#)). ArpA dégrade aussi le protéoglycane de la matrice extracellulaire, une structure majeure de la cornée, et jouerait aussi un rôle dans la nécrose colliquative de la cornée ([Kreger et Gray, 1978](#)).

ZapA est capable de cliver l'immunoglobuline G et l'immunoglobuline A1 et A2, conférant à *P. mirabilis* une résistance à l'opsonisation lors des infections du tractus urinaire ([Loomes et al., 1993](#); [Wassif et al., 1995](#)).

L'extrémité N-terminale de la toxine Sap de *Caulobacter crescentus* est une protéase RTX tandis que l'extrémité C-terminale de Sap est une protéine RTX de la couche S, un groupe de protéine RTX qui sera décrit dans la [section 3.9](#) ([Umelo-Njaka et al., 2002](#)). Ceci démontre l'évolution des toxines RTX et leur capacité d'avoir des caractéristiques de plusieurs toxines différentes. Malgré le fait que Sap ne possède pas de signal peptide de sécrétion, la toxine est quand même sécrétée par un système de sécrétion de type 1 ([Ford et al., 2007](#)).

3.7 Lipases RTX

Les genres *Pseudomonas* et *Serratia* produisent des lipases RTX de la sous-famille I.3 qui ne possèdent pas de résidus cystéine, ne requiert aucun gène supplémentaire pour leur activité et qui sont sécrétées par SST1 ([Ahn et al., 1999](#)). La production de ce type de lipase par *P. fluorescens* B52 est réprimée par le fer et est régulée par la température, où la production de lipase atteint son maximum à une température inférieure à la température optimale de croissance ([Woods et al., 2001](#)). La production est aussi régulée par le système osmorégulateur à deux composantes homologue d'*E.coli* EnvZ-OmpR et elle est réduite par le NaCl ([McCarthy et al., 2004](#)). La production de lipase par *P. brassicacearum* est régulée par les changements de phase ([McCarthy et al., 2004](#)).

Un schéma de l'arrangement génétique des diverses lipases RTX se trouve à la [figure 11](#). Chez *S. marcescens*, le gène de lipase RTX *lipA* ne se trouve pas avec les gènes *lipB*, *lipC* et *lipD* codant pour l'exporteur ABC, la MFP et l'OMP du SST1 respectivement. Ce SST1 exporte, en plus de LipA, la métalloprotéase PrtA et SlaA, une protéine de la couche S ([Nakahama et al., 1986](#); [Kawai et al., 1998](#)). Le gène de la lipase TilA de la souche SIK W1 de *P. fluorescens* se retrouve en aval du système de sécrétion de type 1 qui est lui en aval de la protéase PrtA et l'inhibiteur de protéase Inh ([Ahn et al., 1999](#)). Quant à elle, la souche 33 de *P. fluorescens* regroupe le gène de la lipase avec les gènes d'une protéase alcaline, l'inhibiteur de la protéase et le SST1, *prtA*, *inh* et *aprADEF* respectivement, ainsi qu'avec deux homologues d'une sérine protéase de *Serratia*, *pspA* et *pspB* ([Kawai et al., 1999](#)).

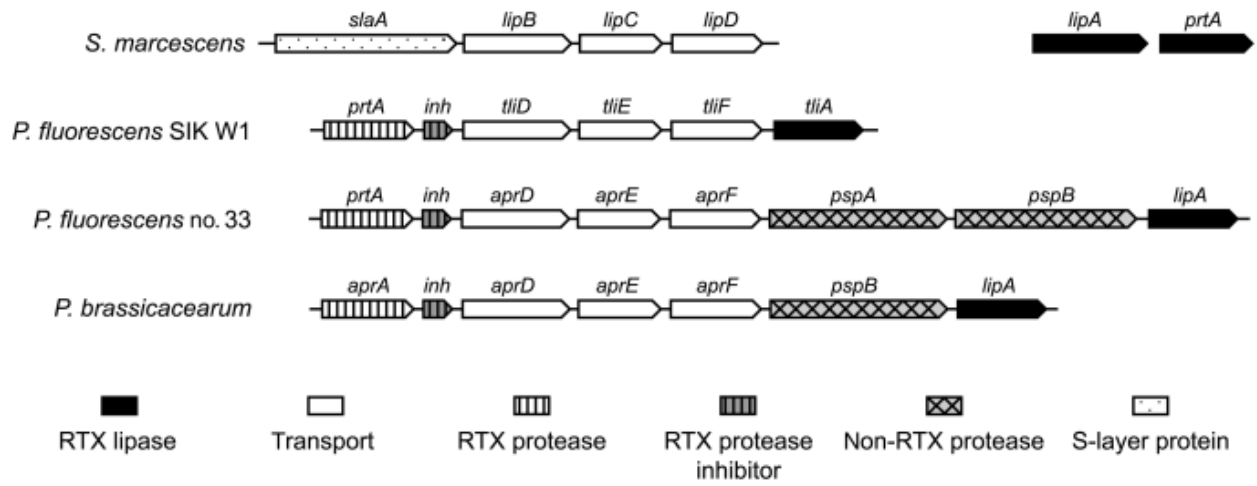


Figure 11 : Arrangement génétique des lipases RTX ([Linhartova et al., 2010](#)).

3.8 Bactériocines

Les bactériocines sont de petits peptides ou protéines thermostables synthétisées par des bactéries qui tuent ou inhibent la croissance d'autres bactéries ([Abrudan et al., 2012](#)). Les bactériocines ont un spectre étroit et la bactérie productrice est résistante à la bactériocine produite ([Abrudan et al., 2012](#)). Des bactériocines de la famille RTX sont retrouvées sur des plasmides chez des bactéries Gram négatifs pathogènes des plantes ou en relation d'endosymbiose avec les plantes ([Linhartova et al., 2010](#)). Le [tableau 2](#) montre les bactéries exprimant les bactériocines RTX.

Tableau 2 : Différentes bactériocines de la famille RTX. Modifié de ([Linhartova et al., 2010](#))

Protéine	Bactérie	Masse moléculaire (kDa)	Nombre de répétitions RTX
ORF	<i>Rhizobium leguminosarum</i> souche 248	102	18
RzcA	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> souche 306	439	18
RtxA	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	88	NA
XF2407	<i>Xylella fastidiosa</i>	219	NA
XF2759	<i>Xylella fastidiosa</i>	139	NA
RtxA	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	48	NA
RzcA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche C58	204	54

3.9 Protéines RTX de la couche S (« S-layer »)

Les protéines de la couche S forment un assemblage cristallin deux dimensionnel couvrant la surface extérieure de plusieurs bactéries archées, capable de s'auto assembler sur la couche de support de l'enveloppe. Les couches S sont composées d'une seule protéine ou glycoprotéine ayant une taille variable entre 40 et 200 kDa ([Sleytr et al., 2007](#)). Des protéines de la couche S furent identifiées chez des bactéries pathogènes et non pathogènes ainsi que chez les cyanobactéries. Ces protéines ont un pH acide, ne contiennent pas de cystéines et sont produites en grande quantité et peuvent composer 10 à 12% des protéines de la cellule ([Sleytr et al., 2007](#)).

Ces protéines de la famille RTX possèdent généralement deux domaines, soit un domaine typique des protéines de la couche S dans la partie N-terminal et des sites de liaison de calcium et un signal peptide non clivable pour le SST1, plus typique de la famille RTX, dans la partie C-terminal ([Sleytr et al., 2007](#)). La liaison du calcium aux répétitions permet une meilleure cristallisation à la surface de la cellule.

La protéine RTX de la couche S la mieux caractérisée est RsaA de *Caulobacter crescentus*, ayant un poids moléculaire de 98 kDa ([Smit et al., 1992](#)). Une sous-unité est formée par la liaison de six monomères RsaA qui pourront lier d'autres sous-unités, ainsi formant une matrice bidimensionnelle d'environ 40 000 RsaA dont la porosité exclurait les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 17 kDa ([Smit et al., 1992](#)). Certains monomères RsaA s'attachent à la surface bactérienne en formant des interactions avec le LPS lisse tandis que d'autres monomères s'unissent avec des monomères déjà attachés à la surface bactérienne ([Ford et al., 2007](#)). La liaison d'ions de calcium permet la bonne cristallisation de RsaA, et des perturbations aux répétitions RTX, ou même proches de celles-ci, résultent en la séparation de RsaA ([Ford et al., 2007](#)). Le rôle de la porosité de la couche formée serait la protection contre les différents dangers de l'environnement ([Ford et al., 2007](#)).

RsaA est synthétisé de façon constitutive, sans induction et de façon continue à travers le cycle cellulaire, par le gène *rsaA* qui se trouve en amont des gènes *rsaD* et *rsaE*, codant la protéine ABC et MFP du SST1 respectivement. Le gène *rsaF_a*, se trouvant à plusieurs kilobases en aval de *rsaA*, code pour une des deux OMP que RsaA peut utiliser pour sa sécrétion. Même si une seule OMP est utilisée pour l'assemblage d'un SST1, les deux OMP sont nécessaires pour maintenir une sécrétion de RsaA équivalente à la souche sauvage ([Toporowski et al., 2004](#)).

Trois protéines de la couche S, Crs, CsxA et CsxB, sont présentes chez *Campylobacter rectus*, une bactérie Gram négatif associée à une parodontite humaine et elles sont des facteurs de virulence permettant l'évasion des défenses de l'hôte tels que la phagocytose et la lyse par le complément ([Thompson, 2002](#); [LaGier et Threadgill, 2008](#)).

3.10 RTX chez les cyanobactéries

Les protéines RTX sont communes chez les cyanobactéries, et certaines jouent un rôle dans la motilité, tel que SwmA de la souche WH8102 de *Synechococcus* sp, l'oscilline de *Phormidium uncinatum* ou la protéine « hemolysin-like » SII1951 de la souche PCC 6803 de *Synechocystis* sp. ([McCarren et al., 2005](#)).

SwmA est une protéine glycosylée de 130 kDa qui contient plusieurs répétitions riches en glycine et aspartate servant à la liaison à la membrane externe, formant ainsi une couche S ([Brahamsha, 1996](#); [McCarren et al., 2005](#)). SwmA, en plus de permettre la formation de la couche S, est requise pour la motilité de la souche WH8102, car un mutant *swmA* est incapable de former la couche S, mais est aussi incapable de se déplacer. Cependant, la rotation suite à l'attachement n'est pas affectée, ce qui indique que SwmA est requise pour la poussée, mais pas pour le torque ([Brahamsha, 1996](#); [McCarren et al., 2005](#)). La chélation par l'EDTA empêche la formation de la couche S en solubilisant SwmA ([Brahamsha, 1996](#); [McCarren et al., 2005](#)).

L'oscilline est une protéine RTX en forme de bâtonnet se trouvant à la surface de la couche S de *P. uncinatum* composée de 646 acides aminés et 46 répétitions ([Hoiczky, 2000](#)). La surface hautement glycosylée de l'oscilline permettrait à *P. uncinatum* de s'adhérer temporairement avant de générer une poussée et glisser dans la direction désirée ([Hoiczky, 2000](#)).

3.11 Nodulation

Une protéine RTX de 30 kDa, NodO, trouvée chez *R. leguminosarum*, joue un rôle dans la nodulation des pois et des vesces ([Sutton et al., 1994](#)). NodO est capable de former des canaux sélectifs aux ions dans des bicouches lipidiques planaires qui sont larges et reste ouvert de façon stable ([Sutton et al., 1994](#)). Le mécanisme d'action de NodO est inconnu, mais deux hypothèses furent émises. La première hypothèse est que NodO formerait des pores dans les cellules de la racine, facilitant le passage de facteurs de nodulation de lipooligosaccharides ([Sutton et al., 1994](#)). La deuxième hypothèse est que le flux de cation à l'intérieur des cellules amplifie le signal des facteurs de nodulation ([Sutton et al., 1994](#)). Les gènes *prsDE* codants pour le SST1 de NodO semblent être conservés chez *Rhizobiaceae*, même lorsque la souche ne contient pas le gène *nodO* ([Finnie et al., 1998](#)). Ce SST1 est nécessaire pour la sécrétion de plusieurs protéines liant le calcium utilisé lors de la formation des nodules et pour les mécanismes de fixation d'azote des nodules, en plus de permettre la sécrétion de PlyA et PlyB, des glycanases ne faisant pas partie de la famille RTX utilisées pour le métabolisme des exopolysaccharides par *Rhizobium* ([Finnie et al., 1998](#)).

4 Système de sécrétion de type 1

L'enveloppe des bactéries Gram négatifs est composée de deux membranes séparées par l'espace périplasmique ([Buchanan, 2001](#)). Les deux côtés de la membrane interne sont identiques et composés majoritairement de trois phospholipides, soit phosphatidyléthanolamine, phosphatidylglycérole et la cardiolipine ([Buchanan, 2001](#)). Les protéines transmembranaires de la membrane interne, qui sont généralement hydrophobiques, permettent le transport de nutriments, la translocation de protéines et fournissent l'énergie à la bactérie par la phosphorylation oxydative ([Buchanan, 2001](#)). Contrairement à la membrane interne, la bicouche lipidique de la membrane externe est asymétrique où la composition de la couche interne de celle-ci est identique à la couche de la membrane interne ([Buchanan, 2001](#)). La couche externe, quant à elle, est composée de lipopolysaccharides reliés par du peptidoglycane contenant des transporteurs permettant l'entrée de nutriment ou l'export de toxines et de déchets ([Buchanan, 2001](#)). La membrane externe est imperméable aux molécules dont la taille est supérieure à 600 Da, protégeant ainsi la bactérie de molécules nocives se retrouvant dans l'environnement ([Buchanan, 2001](#)).

La présence de deux membranes rend le transport chez les bactéries Gram négatifs plus difficile que chez les Gram positifs, puisque les protéines amphiphiles ou hydrophiles doivent passer à travers deux barrières hydrophobiques ([Thomas et al., 2014](#)). Les systèmes de sécrétion de type 1 à 6 ont permis de remédier à la situation ([Thomas et al., 2014](#)). Ces systèmes sont classés en deux types, sec-dépendant où la translocation se fait en deux étapes, d'abord du cytoplasme au périplasma et ensuite l'intermédiaire périplasmique sera transloqué à l'extérieur, et sec-indépendant où le transport se fait directement du cytoplasme au milieu extracellulaire, et ce, en l'absence d'intermédiaire périplasmique stable ([Thomas et al., 2014](#)). Les systèmes de sécrétion de type 1 et 3 sont sec-indépendant, les systèmes 2 et 5 sont sec-dépendant, tandis que le système de type 4 peut être classé dans les deux puisque le mécanisme de sécrétion varie selon le substrat ([Thomas et al., 2014](#)). Le système de sécrétion de type 6 fut découvert récemment et n'est pas encore classé ([Thomas et al., 2014](#)). Étant donné que le SST1 requiert la protéine TolC pour l'export, il est indirectement sec-

dépendant, car les précurseurs de TolC sont exportés au périplasma par un système de sécrétion sec-dépendant ([Werner et al., 2003](#)).

Le système de sécrétion de type 1, le système de sécrétion le plus simple chez les bactéries Gram négatifs et aussi appelé système ABC-dépendant, consiste généralement en trois protéines, soit une protéine canal de la membrane externe, un transporteur ATP-binding cassette (ABC) de la membrane interne et une protéine de fusion membranaire périplasmique liée à la protéine de la membrane interne par une ancre lipidique ou une hélice alpha transmembranaire ([Buchanan, 2001](#); [Holland et al., 2005](#)). La protéine de la membrane interne et la protéine périplasmique sont substrat-spécifique, mais pas la protéine de la membrane externe, souvent un membre de la famille TolC, qui est responsable de la sécrétion de plusieurs substrats ([Buchanan, 2001](#)). Deux modes d'énergies sont requis. La force proton motrice est nécessaire pour la formation du complexe et l'hydrolyse de l'ATP permet la sécrétion du substrat. Ce système transporte des protéines de taille variée, aussi petit que la bactériocine collicine V de 5.5 kDa, des protéines d'une taille de 20 kDa comme le chélateur de fer HasA de *Serratia marcescens* et des systèmes de plus de 900 kDa comme l'adhésine protéique LapA de *Pseudomonas fluorescens* ou les MARTX ([Gilson et al., 1990](#); [Satchell, 2011](#); [Thomas et al., 2014](#)).

Le peptide signal de certaines toxines RTX, dont HlyA, peuvent subir quelques mutations sans affecter le niveau de sécrétion de la toxine, tant et aussi longtemps que la première partie du signal peptide est une hélice alpha amphiphile ([Delepelaire, 2004](#)). Le peptide signal des protéases et lipases RTX ainsi que de HasA est beaucoup plus conservé et plus sensible à des mutations, où certaines mutations ponctuelles peuvent réduire, voir abolir, la sécrétion des protéines, comme par exemple l'ajout d'un tryptophane après le dernier résidu de la métalloprotéase PrtG qui réduit sa sécrétion de 50% ([Delepelaire, 2004](#)). *S. marcescens* possèdent deux systèmes de sécrétion de type 1, pour HasA et pour la lipase LipA qui requière les gènes *lipB*, *lipC* et *lipD* pour sa sécrétion ([Delepelaire, 2004](#)). Ce dernier système peut sécréter, en plus de LipA, la métalloprotéase Prt de cette espèce, mais le SST1 ne reconnaît pas HasA. Chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, le système LipBCD est capable de sécréter la

protéine HasA de ces deux espèces (HasAPa et HasAPf). Étant donné que le signal de sécrétion se retrouve au niveau C-terminal, ceci veut donc dire que la sécrétion ne peut avoir lieu que suite à la traduction complète de la protéine et que cette dernière a le temps d'adopter au moins sa structure secondaire ([Delepelaire, 2004](#)). Dans le cas d'HlyA, le signal peptide se retrouve dans les derniers 60 acides aminés en C-terminal ([Kanonenberg et al., 2013](#)). Des études avec des mutants capables d'adopter une conformation active au niveau du cytoplasme avant l'export, ce qui est possible en induisant les gènes d'export tardivement, montrent que des protéines repliées ne peuvent être sécrétées par le SST1. Toutefois, il y a reconnaissance de la protéine repliée par le transporteur ABC, mais il n'y a aucune sécrétion ([Delepelaire, 2004](#)). HasA, qui n'est pas une protéine RTX mais utilise le SST1 et ayant servi à étudier ce système, nécessite la protéine SecB pour sa sécrétion, malgré le fait que le SST1 est sec-indépendant ([Delepelaire, 2004](#)). HasA se replie très rapidement une fois synthétisé pour adopter sa structure tertiaire, et la liaison par SecB ralentit de beaucoup ce repliement, ce qui permet son export puisqu'une fois repliée HasA ne peut être exportée ([Delepelaire, 2004](#); [Kanonenberg et al., 2013](#)). Le signal peptide des bactériocines et colicines se retrouvent à l'extrémité N-terminal ([Kanonenberg et al., 2013](#)).

4.1 Transporteurs ABC

Tous les transporteurs ABC possèdent une architecture canonique, composés de deux domaines transmembranaires hydrophobes (TMD) formant un canal et deux domaines de liaisons aux nucléotides hydrophiles (NBD) responsables de l'hydrolyse de l'ATP avec l'aide du cofacteur Mg^{2+} ([Schmitt et Tampe, 2002](#); [Oswald et al., 2006](#); [Davidson et al., 2008](#); [Jones et al., 2009](#)). Une liaison entre un domaine TMD et un domaine NBD forme un polypeptide de HlyB, et deux monomères de HlyB formeront un dimère fonctionnel d'environ 66 kDa ([Schmitt et al., 2003](#); [Thomas et al., 2014](#)). HlyB contient, en plus de ces domaines, une extension N-terminal de 130 acides aminés qui est une peptidase C39 tronquée, lui manquant le domaine de clivage. Le rôle de cette peptidase C39 dégénérée est la liaison à HlyA pour empêcher la dégradation de la

toxine par des protéases ou encore l'agrégation de plusieurs HlyA ensemble pendant que la toxine attend dans le cytoplasme pour se faire sécréter ([Lecher et al., 2012](#)). Cependant, le domaine C39 ne reconnaît pas la séquence GG habituelle, mais reconnaît un motif après le signal de sécrétion contenant trois répétitions RTX ([Lecher et al., 2012](#)). Le domaine NBD est très conservé contrairement au domaine TMD, indiquant donc que c'est le domaine TMD qui détermine la spécificité du substrat à transporter ([Delepelaire, 2004](#)). Les transporteurs ABC impliqués dans la sécrétion des produits toxiques pour la bactérie possèdent un domaine RND (resistance-nodulation-cell division) ([Delepelaire, 2004](#); [Kanonenberg et al., 2013](#)).

4.2 TolC

La protéine TolC de 55 kDa est aussi impliquée dans l'export de molécules nuisibles tels les antibiotiques, des solvants organiques et des détergents, et elle est connue comme une pompe d'efflux multidrogue ([Buchanan, 2001](#)). Elle forme un homotrimère dont les monomères sont composés de deux moitiés identiques, probablement le résultat d'une duplication, et les monomères sont constitués de quatre feuilletts bêta composant la partie insérée dans la membrane externe et quatre hélices alpha comprennent la partie périplasmique ([Delepelaire, 2004](#); [Thomas et al., 2014](#)). Le canal formé par TolC est rempli d'eau, et il est presque complètement fermé à l'extrémité cytoplasmique grâce à un pont de sel, mais grand ouvert à l'extrémité extracellulaire ([Delepelaire, 2004](#)). La partie se retrouvant dans le périplasme est trop petite pour permettre le passage d'ions et donc encore moins celle des protéines, et requiert donc un réarrangement des hélices alpha lors de l'export des protéines sous forme de structure secondaire, et le repliement final a lieu dans le milieu extracellulaire ([Thomas et al., 2014](#)). Étant donné que la concentration de calcium est supérieure dans le milieu extracellulaire, soit des concentrations pouvant atteindre 10 mM au lieu de 300 à 500 nM dans le cytoplasme, le repliement ne peut avoir lieu qu'une fois la toxine sécrétée ([Jones et al., 1999](#); [Kanonenberg et al., 2013](#)). Ceci est un bon mécanisme pour s'assurer que le repliement n'ait pas lieu dans le cytoplasme ([Kanonenberg et al., 2013](#)). TolC peut aussi aider à maintenir l'intégrité de la membrane externe, importer

certaines colicines, ainsi que de servir d'un récepteur pour certains phages ([Delepelaire, 2004](#)). Mise à part la sécrétion, TolC semble jouer un rôle au niveau du repliement de la toxine HlyA. En effet, des mutants de TolC dont la sécrétion n'est pas affectée ne peuvent exporter des toxines actives et HlyA forme des agrégats entre eux ([Delepelaire, 2004](#)). Des étapes de dénaturation et de renaturation *in vitro* permettent de récupérer des toxines actives, montrant donc que l'absence de certains résidus dans le canal TolC empêche le bon repliement de la toxine, probablement à cause de manque de certaines interactions entre les deux protéines ([Delepelaire, 2004](#)).

4.3 Assemblage

Le modèle accepté de l'assemblage du SST1 est qu'une liaison entre HlyD et HlyB permet à cette dernière de reconnaître HlyA, et la reconnaissance du substrat cause un changement de conformation d'HlyD qui pourra recruter et lier TolC ([Letoffe et al., 1996](#); [Thanabalu et al., 1998](#)). Une extension à l'extrémité N-terminale cytoplasmique d'HlyD est essentielle à la reconnaissance du substrat HlyA ([Balakrishnan et al., 2001](#)). Il est intéressant à noter qu'en absence d'HlyB, la protéine HlyD de 53 kDa est déstabilisée et dégradée ([Landraud et al., 2003](#)).

5 Formation de pores

La toxine HlyA, comme décrite auparavant, est toxique pour les érythrocytes, les monocytes, les lymphocytes, les neutrophiles, les cellules épithéliales rénales, les cellules endothéliales et les fibroblastes ([Thomas et al., 2014](#)). Il existe trois mécanismes de formation de pores, soit la formation de pore de manière récepteur-indépendant, la formation de pore de façon récepteur-dépendant et la formation de pore par l'association entre HlyA et des vésicules de la membrane externe.

5.1 Formation de pores récepteur-indépendant

L'idée que l'effet de HlyA est indépendant de la présence de récepteurs à la surface cellulaire est due à la liaison de la toxine à des membranes planaires et des vésicules unilamellaires ([Ostolaza et al., 1993](#); [Menestrina et al., 1994](#)). Des études sur des érythrocytes de lapin montrent une adhésion non saturable de la toxine, ce qui signifie que la liaison ne se fait pas via un récepteur spécifique ([Valeva et al., 2005](#)). La liaison semble toutefois être faite par une adsorption réversible et une insertion irréversible ([Bakas et al., 1996](#)).

5.2 Formation de pores récepteur-dépendant

L'idée derrière cette hypothèse est que certaines toxines RTX ont besoin d'un récepteur, expliquant donc la spécificité très étroite de certaines toxines ([Thomas et al., 2014](#)). De plus, des anticorps ciblés à certains récepteurs, telle que la $\beta 2$ intégrine, empêchent la lyse des cellules cibles par HlyA ([Lally et al., 1997](#)). L'absence de lyse de certaines lignées cellulaires, entre autres K562, s'explique donc par l'absence de récepteurs $\beta 2$ intégrine à la surface cellulaire ([Morova et al., 2008](#)). Les érythrocytes ne possèdent pas de récepteurs $\beta 2$ intégrine, mais étant donné que les toxines reconnaissent la partie glycosylée des récepteurs, la lyse des globules rouges est toujours possible puisque ces cellules possèdent des récepteurs glycosylés, tels que la glycophorine nécessaire pour la liaison par HlyA et les gangliosides pour la liaison par CyaA ([Cortajarena et al., 2001](#); [Morova et al., 2008](#)). La reconnaissance de sucre à la

surface des érythrocytes expliquerait donc le manque de spécificité de la reconnaissance des érythrocytes provenant de différentes espèces ([Thomas et al., 2014](#)).

5.3 Formation de pore par l'association de la toxine avec des vésicules de la membrane externe

Les bactéries Gram négatifs forment beaucoup de vésicules de la membrane externe (OMV), une conséquence du métabolisme et de la croissance normale bactérienne ([Balsalobre et al., 2006](#)). Les OMV sont essentielles pour l'activation de la cytolysine ClyA, et environ le deux tiers des toxines HlyA produites par une bactérie sont associées avec les OMV ([Balsalobre et al., 2006](#)). De plus, la toxine EhxA de la souche d'*E. coli* O157:H7 peut être retrouvé sous forme libre ou en association avec les OMV, et ce, de façon indépendante de l'acylation de la toxine ([Aldick et al., 2009](#)).

La forme la plus souvent retrouvée de EhxA est celle en association avec les OMV ([Aldick et al., 2009](#)). Il est intéressant à noter que la toxine EhxA associée aux OMV est 80 fois plus stable, et sa demi-vie augmente de 15 minutes à 20 heures ([Aldick et al., 2009](#)). Aucune perte d'activité des toxines associées aux vésicules n'a été observée, et même que la présence des vésicules permet aux toxines d'être très résistantes aux traitements d'urée ([Balsalobre et al., 2006](#)). Le mécanisme de cytotoxicité de la toxine EhxA diffère selon la forme dans laquelle elle se retrouve. EhxA en forme libre lyse les cellules cibles en formant un pore dans la membrane cytoplasmique, tandis que la forme d'EhxA associée aux OMV ne lyse pas les cellules cibles ([Bielaszewska et al., 2014](#)). La toxine est internalisée et endommage la mitochondrie, ce qui induit l'apoptose médiée par la caspase-9 ([Bielaszewska et al., 2014](#)). L'avantage de l'induction de l'apoptose au lieu de lyser les cellules est que l'apoptose n'induit pas la sécrétion d'IL-1 β des macrophages, ce qui empêche le déclenchement de l'inflammation et de la réponse immunitaire et contribue à la virulence des EHEC ([Bielaszewska et al., 2014](#)). La toxine semble se retrouver dans des OMV suite à la formation des vésicules à l'endroit de la machinerie de sécrétion de type 1 de façon aléatoire puisque TolC, une composante du SST1, se retrouve dans la

vésicule ([Balsalobre et al., 2006](#)). Des études ont démontré qu'EhxA s'associe à la membrane externe aux OMV suite à la sécrétion de la toxine dans le milieu extracellulaire à cause de la forte affinité de la toxine pour les OMV ([Bielaszewska et al., 2014](#)). L'association d'EhxA aux OMV est présentée dans la [figure 7](#) à la [section 3.1.2](#). Le mécanisme susceptible d'être en jeu pour l'acheminement de la toxine à la cellule eucaryote est l'endocytose ([Kesty et al., 2004](#)).

6 Oligomérisation

Il existe deux hypothèses concernant l'oligomérisation de la toxine, avec des expériences soutenant l'idée qu'une oligomérisation n'est pas requise par la toxine afin de causer la lyse cellulaire et d'autres expériences qui démontrent que l'oligomérisation est nécessaire pour avoir un effet toxique.

Il a déjà été démontré qu'une seule molécule d'HlyA est suffisante pour causer la lyse d'une cellule ([Benz et al., 1992](#)). De plus, l'absence d'isolation de polymères d'HlyA suggère qu'il n'y a pas d'oligomérisation de la toxine, mais d'autres études comme l'effet de la concentration de toxine qui, en augmentant, a un grand effet sur la conductance membranaire indiquent plutôt que l'oligomérisation est requise ([Benz et al., 1992](#)). Le temps, la température et la concentration de toxine ont chacun un rôle important dans la formation de pores ([Moayeri et Welch, 1994](#)). L'augmentation de la taille du pore crée par HlyA avec le temps montre que, tout comme le complément, HlyA a une fonction semblable à un détergent, c'est-à-dire, qu'elle cause la déstabilisation de la membrane, la perte de l'effet de barrière de la membrane, dissipation du gradient électrochimique transmembranaire et perte des constituants cytoplasmique ([Ostolaza et al., 1993](#); [Bechinger et Lohner, 2006](#)). Des études plus récentes montrent que la toxine est capable d'oligomérisation, un procédé dynamique fonction du temps, de la concentration de toxines et de la fluidité membranaire ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). En fait, il semble que l'acylation des résidus lysines est requise pour l'oligomérisation puisque l'ajout des résidus acyles cause un changement de conformation qui expose des régions désordonnées dans la structure tertiaire protéique qui permettent des interactions protéines-protéines et la formation de pores ([Wiles et Mulvey, 2013](#)).

La formation de pore commence par l'attachement d'un monomère d'HlyA avec la membrane de la cellule cible via des interactions électrostatiques suivies par un rapprochement causé par un changement de conformation médié par sa forme globulaire suite à l'attachement ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). Un ancrage irréversible des hélices alpha de la toxine avec la membrane cellulaire expose des régions

désordonnées ce qui permet des interactions protéines-protéines ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). Finalement, des monomères sont concentrés et une oligomérisation dynamique peut avoir lieu pour former un pore, étape dépendante de la localisation des microdomaines et des radeaux lipidiques ([Wiles et Mulvey, 2013](#)).

7 Effet cytotoxique

Une faible concentration d'HlyA promeut une réponse inflammatoire, mais il a récemment été remarqué que selon le type cellulaire et le temps d'expression de la toxine, HlyA est capable de supprimer la réponse immunitaire de l'hôte contre l'infection, principalement en empêchant la production de cytokines ([Wiles et Mulvey, 2013](#)).

Chez les cellules épithéliales de vessie, HlyA cause aussi l'inactivation de la sérine-thréonine kinase Akt qui est importante pour la survie cellulaire, les voies de signalisations métaboliques et immunitaires ainsi que la régulation du cytosquelette ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). Le mécanisme d'inactivation d'Akt et si celle-ci est une cible primaire ou secondaire de la toxine reste à être élucidée. HlyA stimule la dégradation rapide de RelA, sous-unité du régulateur NF- κ B, et de plusieurs régulateurs des protéines du cytosquelette, dont la paxilline, HDAC-6 et PAK-1 chez les cellules épithéliales de la vessie et les macrophages, résultant en l'activation des sérines protéases de l'hôte ([Wiles et Mulvey, 2013](#)).

La formation de pores par des toxines, de la famille RTX ou autre, active des mécanismes de survie chez la cellule eucaryote, grâce à l'activation de la MAPK p38 ([Kloft et al., 2009](#)). La liaison de l'alpha hémolysine de *S. aureus* cause un efflux de K^+ qui est capable d'activer la caspase-1, une sérine protéase de 45 kDa qui nécessite une activation par autoprotéolyse ([Olson et Gouaux, 2005](#); [Gurcel et al., 2006](#)). L'incubation de cellules eucaryotes en présence de K^+ dans le milieu inhibe l'efflux de K^+ et l'activation de p38 et permet aux cellules de survivre à la lyse par l'alpha hémolysine de *S. aureus* ([Kloft et al., 2009](#)). Le même phénomène a lieu avec la cytolysine de *Vibrio cholerae* (VCC), HlyA d'*E. coli* et la streptolysine O ([Kloft et al., 2009](#)). La présence d'une forte concentration de K^+ n'inhibe pas l'activation de p38 d'une façon non spécifique puisque l'ajout de peroxyde est capable d'activer p38 ([Kloft et al., 2009](#)). Étant donné que la toxine HlyA est complexée avec le LPS et que celui-ci pourrait activer la p38, un test fut effectué avec la ligne cellulaire A498 déficiente pour le récepteur CD14 et donc insensible au LPS. L'activation de p38 dans ces conditions

démontre que cette activation est bien due à la formation de pore par la toxine ([Kloft et al., 2009](#)).

L'autoprotéolyse de la procaspase-1, nom donné à la caspase non activée, est dépendante de la formation du complexe de l'inflammasome qui permet d'apporter les procaspase-1 à proximité l'une de l'autre ([Gurcel et al., 2006](#)). Il y a deux types d'inflammasomes qui varient selon les récepteurs intracellulaires de reconnaissance de motifs moléculaires de la famille des NLR (NACHT-LRR; « NOD-Like Receptor ») ([Gurcel et al., 2006](#)). Les NLR reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP- « pathogen associated molecular pattern »), faisant donc des inflammasomes des détecteurs intracellulaires de signaux de danger ([Gurcel et al., 2006](#)). Les récepteurs NLR sont composés de trois domaines, un domaine riche en répétitions de leucine (LRR) responsable de la reconnaissance du ligand, un domaine d'oligomérisation NACHT et un domaine d'interaction protéine-protéine qui peut soit être un domaine de recrutement de caspase (CARD) ou un domaine pyrine ([Gurcel et al., 2006](#)). NALP et IPAF, en particulier NALP-1 et NALP-3, sont deux NLR capables d'induire l'activation de la caspase-1, où NALP nécessite une protéine adaptatrice ASC, qui elle possède un domaine CARD, pour interagir avec la caspase-1 tandis que IPAF peut interagir directement avec la caspase-1 via son domaine CARD ([Martinon et Tschopp, 2005](#)). L'aérollysine augmente l'expression des protéines SREBP-1 et SREBP-2 (« sterol regulatory element binding protein »). SREBP est un facteur de transcription membranaire qui régule l'expression de gènes ayant, au niveau de leur promoteur, un élément répondant au stérol (SRE) et qui sont impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des acides gras ([Goldstein et al., 2006](#)). Il existe trois types de SREBP. SREBP-1a et SREBP-1c sont codés par un seul gène et sont impliqués principalement dans le métabolisme des acides gras, tandis que SREBP-2 est codé par un gène distinct et contrôle la biosynthèse du cholestérol et des acides gras ([Goldstein et al., 2006](#)). Les SREBP peuvent être activés par déplétion de cholestérol et la déplétion de calcium du réticulum endoplasmique ([Goldstein et al., 2006](#); [Gurcel et al., 2006](#)). La HMGCoA réductase et l'acide gras synthase sont activés par SREBP-2 et SREBP-1 respectivement et leur niveau d'expression augmente suite à la liaison par la toxine, causant aussi l'augmentation de la quantité de cholestérol

cellulaire de 25% à 30% dans les heures suivant l'infection ([Gurcel et al., 2006](#)). L'activation des SREBP nécessite la formation de pores ([Gurcel et al., 2006](#)). La chélation du calcium extracellulaire ou intracellulaire n'empêche pas l'activation de SREBP-2, donc ni l'influx de calcium ni l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium ne sont la cause de l'activation de SREBP-2 ([Gurcel et al., 2006](#)). Toutefois, l'efflux de potassium des cellules cause l'activation de SREBP-2, et ce facteur de transcription n'est pas exprimé lorsqu'il y a inhibition de l'efflux de K⁺ ([Gurcel et al., 2006](#)). L'aérollysine finit par activer la caspase-1 via les inflammasomes IPAF et NALP3 ([Gurcel et al., 2006](#)). L'efflux de potassium active la caspase-1, et l'activation de celle-ci est nécessaire pour qu'il y ait activation de SREBP-1 et SREBP-2 ([Gurcel et al., 2006](#)). L'activation des gènes reliés aux gras permet de réparer la membrane cytoplasmique endommagée par les pores et donne une chance à la cellule de survivre. La [figure 12](#) montre l'activation des SREBP.

En résumé, une baisse de la concentration du potassium cytoplasmique suite à la formation d'un pore par une toxine mène à l'activation de l'inflammasome et donc de la caspase-1 ([Gurcel et al., 2006](#)). Celle-ci finit par causer l'activation des SREBP qui vont augmenter l'expression des gènes lipogéniques, ce qui va promouvoir la survie cellulaire. La caspase-1 est connue pour être responsable dans l'activation de l'apoptose, mais elle semble aussi jouer un rôle dans la survie cellulaire ([Gurcel et al., 2006](#)). Le mécanisme entrepris semble dépendre du type cellulaire. En effet, chez les cellules non immunitaires, un mécanisme de survie semble être favorisé tandis que chez les cellules immunitaires, les mécanismes d'apoptose sont activés ([Huffman et al., 2004](#); [Gurcel et al., 2006](#)).

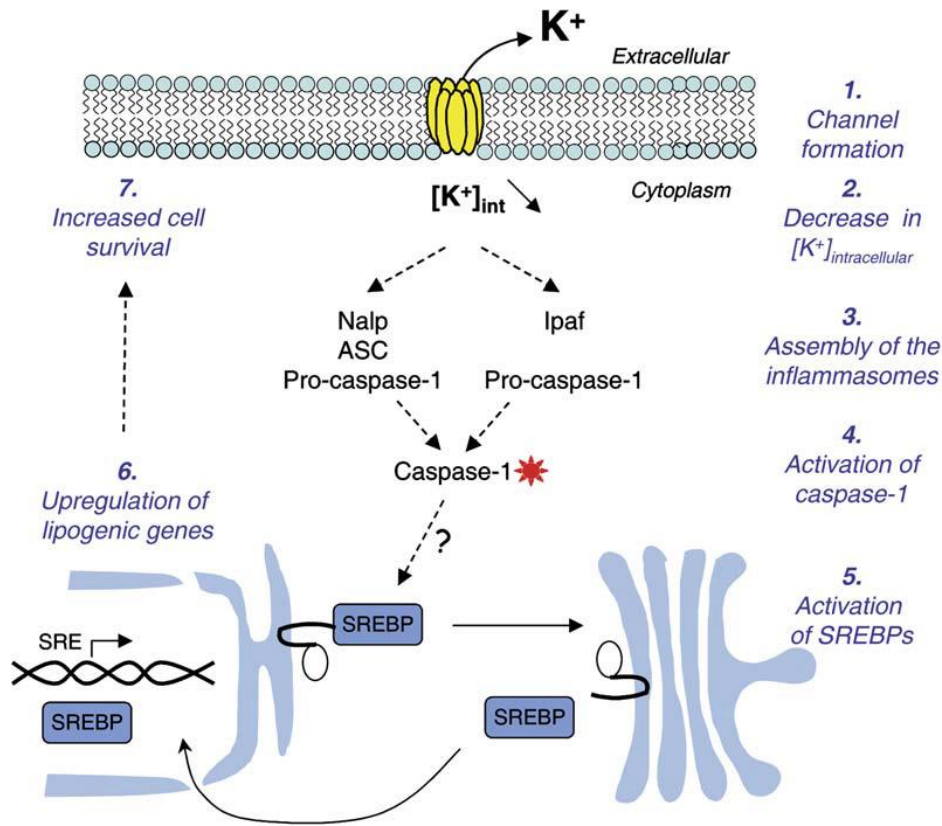


Figure 12 : Activation des SREBP suite à l'efflux de K^+ (Gurcel et al., 2006)

À des concentrations sublytiques, les cellules eucaryotes utilisent les protéines MAPK p38 et JNK, des protéines kinases activées par le stress, pour essayer de survivre à la lyse (Cancino-Rodezno et al., 2010). Les membres de la famille MAPK sont des sérines/thréonines kinases importantes dans la régulation intracellulaire en réponse à des signaux extracellulaires et du stress, tels que la radiation, un choc osmotique et une lésion ischémique, et permettent d'activer les défenses de l'hôte nécessaire pour la survie et l'adaptation (Porta et al., 2011). Une cascade de signalisation finit par mener à la phosphorylation des cibles de la MAPK, qui peuvent être des facteurs de transcription, des coactivateurs ou des corépresseurs. Les différentes réponses engagées dépendent des motifs de liaison et des protéines d'échafaudage (Porta et al., 2011). p38 est activée par l'efflux de potassium et l'influx de calcium causé par la toxine (Porta et al., 2011). Les protéines MAPK p38 et JNK seraient responsables de l'activation des caspases apoptotiques 3, 6 et 9 qui résulte en la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Porta et al., 2011).

À de faibles concentrations d'HlyA, il a été remarqué que les pores s'ouvrent et se referment très rapidement, soit scellés ou enlevés de la membrane par des mécanismes cellulaires ([Koschinski et al., 2006](#)). Il a aussi été démontré que l'influx de calcium se fait seulement à travers le pore créé par HlyA, et il n'y a aucune activation de canaux de calcium ([Koschinski et al., 2006](#)). L'entrée de calcium se fait en plusieurs pic au fur et à mesure qu'HlyA forme un pore puis se referme, et ces pics de calcium sont fonction de la concentration de toxines et aucune périodicité n'est observable ([Koschinski et al., 2006](#)). Encore en utilisant de faibles concentrations de toxines, les cellules commencent à stocker le calcium intracellulaire et activent les pompes d'efflux de calcium afin de rétablir l'homéostasie du calcium ([Koschinski et al., 2006](#)).

HlyA est capable de causer la mort des cellules NK (natural killer cells) et ces cellules immunitaires sont recrutées au site de l'infection urinaire ([Gur et al., 2013](#)). En l'absence de HlyA, le compte bactérien diminue très rapidement suite à la migration des cellules NK, et l'importance de ces cellules pour le contrôle d'une infection urinaire démontre le rôle important de HlyA dans la survie bactérienne et prolongation de l'infection ([Gur et al., 2013](#)).

Il est important à noter que les mécanismes concernant la toxine sont toujours controversés. Par exemple, certaines études ont démontré que l'acylation est importante pour la liaison tandis que d'autres ont démontré qu'HlyA, acylé ou non, est capable de lier la cellule cible. La même problématique existe aussi pour l'importance du calcium, où certaines études montrent que cet ion est important pour la reconnaissance cellulaire, mais pas pour la formation de pore, alors qu'une autre étude montre qu'en absence de calcium, HlyA est capable de lier des bicouches lipidiques et des liposomes.

PROBLÉMATIQUE

Le génome d'une souche d'*E. coli* APEC O1, isolé d'un cas de colibacillose de dinde en France durant l'année 1982, fut séquencé par notre laboratoire et elle possédait un plasmide de virulence de type ColV d'une taille de 218 kbp, environ deux fois la taille moyenne des plasmides ColV. Cette souche fut nommée QT598 et son plasmide de virulence, pEC598, est présenté dans la [figure 13](#). Une région unique de 20 kbp, généralement absente de ce type de plasmide, fut découverte. Cette région encode plusieurs nouveaux facteurs de virulence putatifs, soit des gènes correspondants à un système de fimbriae, un autotransporteur et une toxine RTX. Le nom donné à la toxine RTX est « plasmid-encoded RTX toxin » (prt). L'opéron de la toxine Prt, présenté dans la [figure 14](#), code pour quatre gènes, soit le gène *prtC* (produit de 169 aa), *prtA* (produit de 866 aa), *prtB* (produit de 703 aa) et *prtD* (produit de 472 aa).

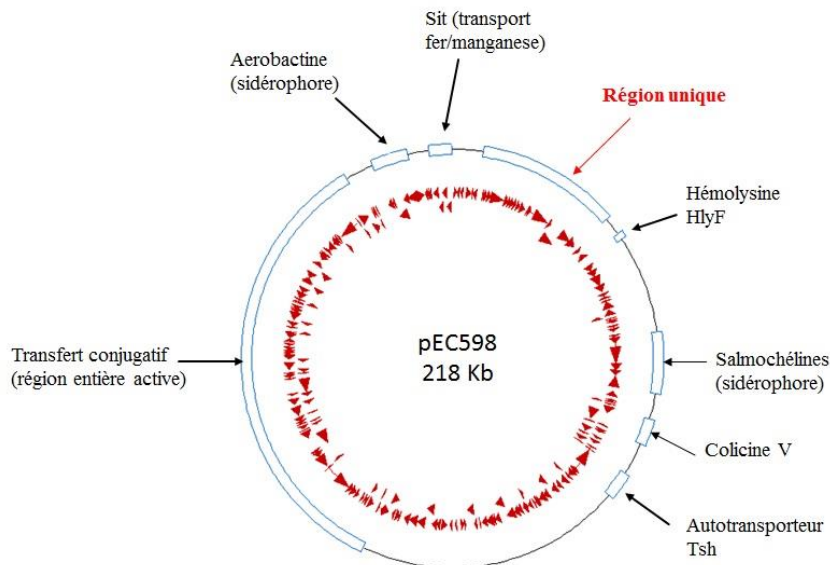


Figure 13 : Le plasmide ColV pEC598 d'une taille de 218 kbp provenant de la souche QT598 séquencée par notre laboratoire. Il encode plusieurs facteurs de virulence, tels que les salmochélines, l'hémolysine HlyF, la colicine V, Tsh et Sit. Le plasmide contient aussi des gènes de synthèse de l'aérobactine, mais celle-ci est tronquée à cause de la présence d'un codon « stop » prématuré qui inactive le gène *iucD*. Ce plasmide contient aussi une région unique,

généralement absente des plasmides CoIV, encodant un nouvel autotransporteur, un nouveau fimbriae et une nouvelle toxine RTX.

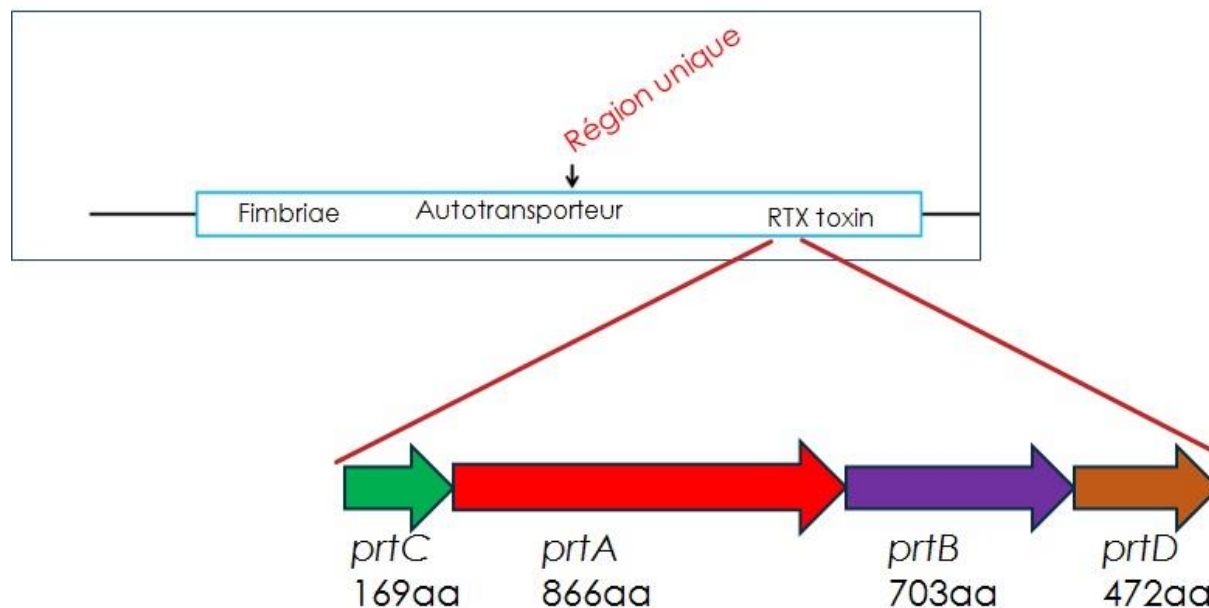


Figure 14 : Région unique retrouvée sur le plasmide CoIV pEC598 encodant un fimbriae, un autotransporteur et une toxine RTX. L'opéron de la toxine RTX contient quatre gènes, soit prtC, prtA, prtB et prtD.

L'hypothèse de ce projet est que le système Prt code pour une toxine de type RTX et les gènes nécessaires pour une activité cytotoxique et/ou l'export de la toxine. De plus, cette toxine jouera un rôle dans la virulence de la souche dans le modèle aviaire ou urinaire. Le modèle urinaire fut aussi choisi, car les souches d'*E. coli* du séro groupe O1 se retrouvent souvent chez les APEC et les UPEC et peuvent appartenir à des groupes clonaux associés également aux infections extra-intestinales chez la volaille et les humains. De plus, cette souche encode des facteurs de virulence plus souvent retrouvés chez les UPEC. Les toxines RTX se retrouvent très rarement chez les souches APEC, tandis que 50% des souches UPEC encodent la toxine RTX HlyA. Étant donné la possibilité que la souche QT598 puisse causer une infection urinaire chez le modèle murin, la décision fut donc prise de tester ce modèle.

Les buts de ce projet sont de :

- 1) Caractériser globalement la toxine Prt de la souche QT598
- 2) Déterminer les cellules cibles de la toxine
- 3) Élucider la régulation potentielle de l'opéron *prt*.

Pour ce faire, il fallait commencer par établir l'homologie du système Prt avec d'autres systèmes RTX chez les génomes bactériens en effectuant des alignements de séquences et la construction d'arbres phylogénétiques. Ensuite, il fut nécessaire de cloner l'opéron *prt* dans un plasmide transformé dans une souche d'*E. coli* K-12 non pathogène et de tester l'effet de la toxine sur différent type de cellules eucaryotes, incluant les macrophages humains THP1, les fibroblastes aviaires CEC-32, les cellules urothéliales humaines 5637, les cellules rénales humaines HEK-293 et les érythrocytes ovins, humains et aviaires. La mutation de chaque gène de l'opéron permit de déterminer le rôle de chacun des gènes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les souches utilisées lors des expériences sont présentées dans le [tableau 3](#).

Tableau 3 : Liste des souches utilisées ainsi que leurs résistances aux antibiotiques.

Code inventaire	Caractéristique	Résistance antibiotiques (concentration utilisée)
pIJ479	DH5- α <i>prtCABD</i>	Ampicilline (100 μ g/ml)
pIJ489	DH5- α Δ <i>prtC</i>	Ampicilline (100 μ g/ml)
pIJ490	DH5- α Δ <i>prtA</i>	Ampicilline (100 μ g/ml)
pIJ491	DH5- α Δ <i>prtB</i>	Ampicilline (100 μ g/ml)
pIJ492	DH5- α Δ <i>prtD</i>	Ampicilline (100 μ g/ml)
pIJ515	QT598 WT <i>prt-luxCDABE</i>	Chloramphénicol (30 μ g/ml)
QT3576	DH5- α pUCm-T vide	Ampicilline (100 μ g/ml)
QT3696	QT598 WT	N/A
QT4421	QT3696 Δ <i>lac</i>	Kanamycine (50 μ g/ml)
QT4430	DH5- α <i>hlyCABD</i>	Chloramphénicol (30 μ g/ml)
QT4450	JW5503-1 Δ <i>tolC</i>	Kanamycine (50 μ g/ml)
QT4451	QT3698 Δ <i>prtCABD</i>	Chloramphénicol (30 μ g/ml)
QT4680	BW25113 Δ <i>hns prtCABD</i>	Kanamycine (50 μ g/ml); Gentamicine (15 μ g/ml)
QT4685	BW25113 WT <i>prtCABD</i>	Gentamicine (15 μ g/ml)

Les amorces utilisées lors des clonages, les sites de restriction présents et la séquence des amorces se trouvent au [tableau 4](#).

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées.

Amorce	Caractéristique	Site de restriction	Séquence 5'→3'
CMD1789	<i>prtA</i> criblage sens	N/A	AGG GCA GCA TCA CTC TGA AC
CMD1790	<i>prtA</i> criblage anti-sens	N/A	GAA TGT GGT CGT GTC CAT CG
CMD1802	<i>prtCABD</i> clonage sens	BamHI	ACA AGG ATC CAG GTA TTG TCG GTA TTC GAT ATG AG
CMD1803	<i>prtCABD</i> clonage anti-sens	XbaI	GAC CTC TAG ATG TTG GCT ACT CCC GAC ATA
CMD1903	Δ <i>prtC</i> sens	SpeI	ACA AGA CTA GTC ACA GAA TTT CAT GCA GGT AAG GTC G
CMD1904	Δ <i>prtC</i> anti-sens	SpeI	TGA AGA CTA GTA CAT CCC CAA AGC CAG GCG G
CMD1905	Δ <i>prtA</i> sens	SpeI	GCT TCA CTA GTT CCG AAG TCG ACA AGC CCC AG
CMD1906	Δ <i>prtA</i> anti-sens	SpeI	CCC AGA CTA GTC GCT GCG AGC GCC AAA TCT TTC
CMD1907	Δ <i>prtB</i> sens	SpeI	ATC GGA CTA GTA CCG TGA GGA TGG CTG ACC G
CMD1908	Δ <i>prtB</i> anti-sens	SpeI	ATA CTA CTA CTG CAT GAC CAG CGC AGA AAG TGC
CMD1909	Δ <i>prtD</i> sens	SpeI	TAA GGA CTA GTG CTT TGT TTC GCC CGG ACA GG
CMD1910	Δ <i>prtD</i> anti-sens	SpeI	AAT CAA CTA GTT CCC GTA GCC GTT TGG GAG C
CMD1911	<i>prtCABD</i> sens	SpeI	AGGCCTGGCTGCATGTTGAAAAATAAACTAT TTAAATTTTACGTATATGGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC
CMD1912	<i>prtCABD</i> anti-sens	SpeI	TTTGTGGCTACTCCCGACATAGCAAGAATTA ACGTTTCAGTCATGCTCTCATGGGAATTAGCCA TGGTCC

CMD1941	<i>ΔprtC</i> criblage	N/A	GCG CCT TGC CAT CCT GTC AC
CMD1942	<i>ΔprtD</i> criblage	N/A	CGA TAC CAT GCA AGT AAC CGT GAC GAG
CMD2049	Promoteur <i>prt</i> sens	Xmal	AGC TCA CTA GTG GAT CCC CCG GGA GGT ATT GTC GGT ATT CGA TAT GAG
CMD2050	Promoteur <i>prt</i> anti-sens	XhoI	ATG GGG CCC ACC TCC TCG AGA CAT CCC CAA AGC CAG GCG G

8.1 Similarité des protéines

La comparaison des séquences protéiques des produits prédits des gènes *prtCABD* fut accomplie grâce à BLASTp sur le serveur de NCBI ([Altschul et al., 1990](#)). L'arbre phylogénétique utilisa le programme MEGA 6 en faisant un alignement de séquences par ClustalW et le type d'arbre choisi fut le « Neighbor-Joining Tree » ([Tamura et al., 2013](#)).

8.2 Clonage avec vecteur-T

L'amplification de l'opéron *prt* fut effectuée avec les amorces CMD1802 et CMD1803 en utilisant l'enzyme fidèle Q5 (NEB) avec une température d'hybridation de 60°C. Suite à la purification du fragment d'ADN amplifié, il y eut une incubation avec la TAQ polymérase (Bio Basic Inc) afin d'ajouter des adénines aux extrémités du fragment d'ADN. Par la suite, on incuba le fragment avec le plasmide linéaire (Bio Basic Inc) ayant des thymines aux extrémités avec une ligase (Fermentas) afin d'avoir une ligation entre les adénines et thymines avant de transformer dans la souche *Escherichia coli* K-12 DH5- α . L'insertion du gène cible se fait dans le gène codant pour la bêta-galactosidase, permettant d'effectuer un premier criblage blanc/bleu, où les bactéries ayant incorporées les gènes *prtCABD* formeront, sur milieu solide avec IPTG (Bio Basic Inc) et X-gal (Bio Basic Inc), des colonies blanches, tandis que celles n'ayant pas incorporé un fragment d'ADN formeront des colonies bleues puisque le gène de la bêta-galactosidase ne sera pas interrompu. La ligation fut ensuite transformée dans la souche DH5- α et l'étalement se fit sur milieu solide LB avec 100 μ g/ml d'ampicilline, 0.08 mM d'IPTG et 0.1 mg/ml de X-gal. La [figure 15](#) montre l'organisation du vecteur

pUCm-T et la [figure 16](#) montre la sélection de colonies. Les colonies blanches furent ensuite criblées par PCR pour la détection du gène *prtA* avec les amorces CMD1789 et CMD1790. Le vecteur pUCm-T-*prtCABD* porte donc le nom pIJ479 et la souche DH5- α avec ce plasmide porta le code pIJ479.

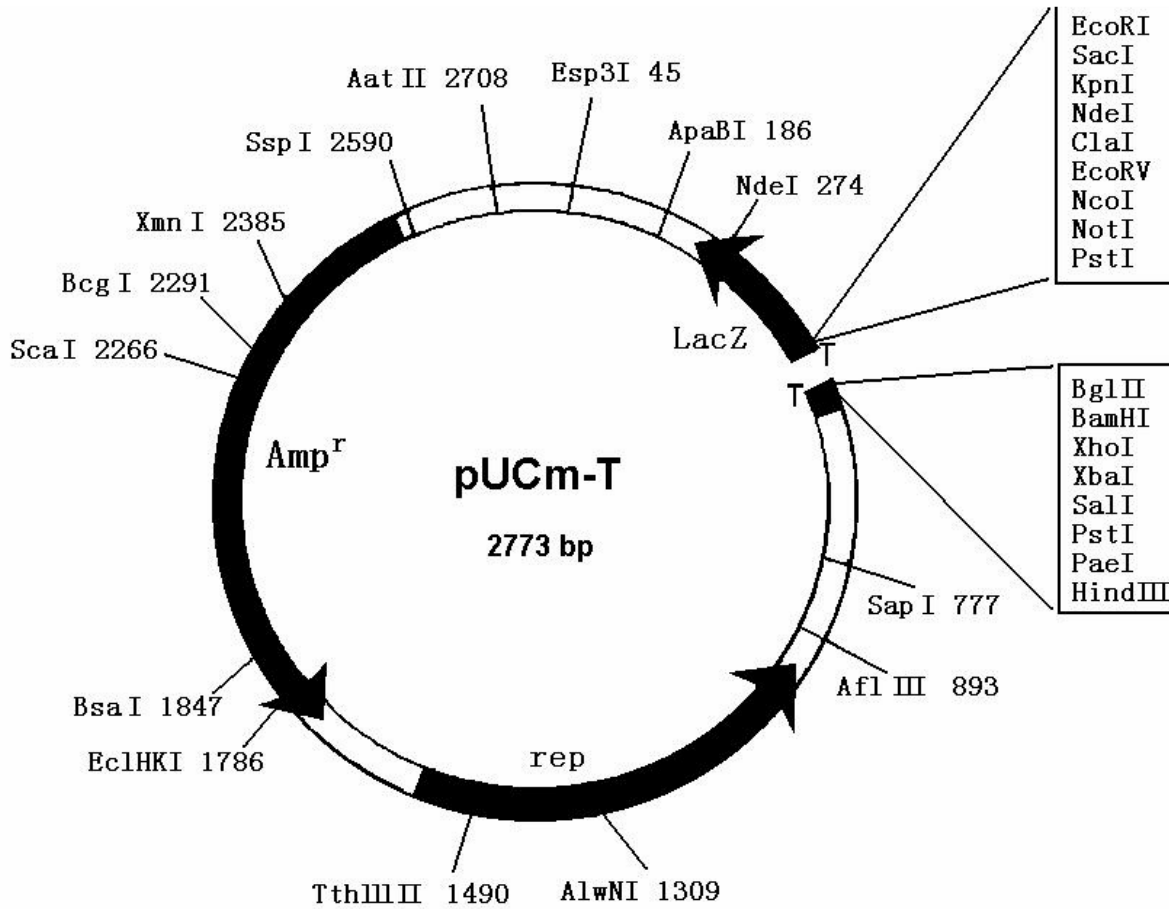


Figure 15: Organisation génomique du vecteur linéaire pUCm-T vide où le site de multiclonages est localisé dans le gène *lacZ* (Bio Basic Inc)

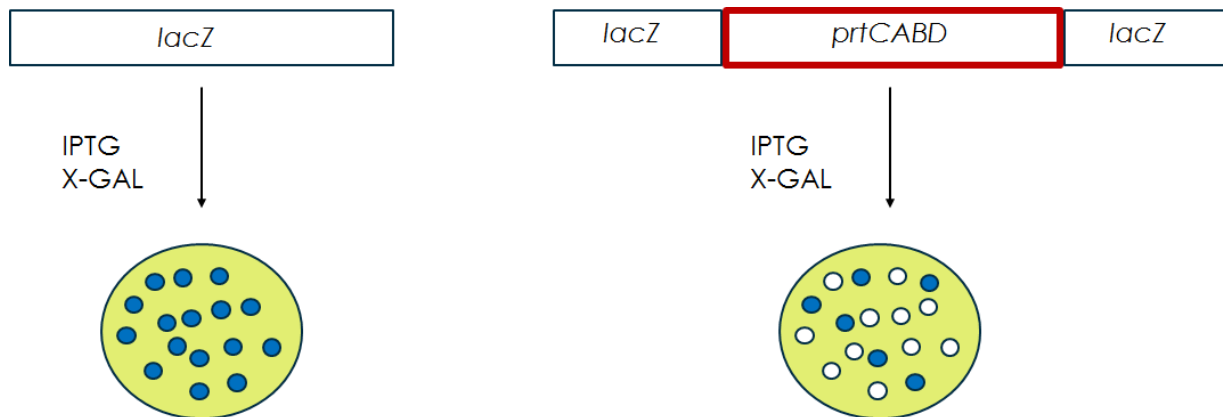


Figure 16 : Sélection des colonies suite au clonage d'un fragment d'ADN dans le vecteur pUCm-T.
a : Lorsqu'aucun fragment d'ADN n'est inséré, le gène *lacZ* se referme et la protéine complète peut être synthétisée en présence de lactose ou d'IPTG, et la métabolisation du X-Gal par celle-ci formera un composé bleu, résultant par l'apparence de colonies bleues sur milieu solide. **b :** L'insertion d'ADN interrompe le gène *lacZ* et une protéine fonctionnelle ne peut être synthétisée, et ces colonies auront donc une allure blanche.

8.3 Obtention des mutants

8.3.1 Mutants des gènes individuels de l'opéron *prtCABD*

Les mutants des gènes individuels de l'opéron *prtCABD* furent obtenus par PCR inverse. À partir du plasmide pUCm-T, des amorces avec des sites de restriction reconnaissant les extrémités du gène qu'il faut enlever servirent pour une amplification PCR en utilisant la polymérase fidèle Q5, suivit d'une digestion, ligation et transformation, permettant d'enlever le gène et de garder le reste du système. Un criblage par PCR en observant un changement de taille entre le plasmide encodant les quatre gènes du système et celui ayant une délétion pour un des quatre gènes servit de confirmation de la délétion du gène. Les amorces CMD1903 à CMD1910 présentés dans le [tableau 4](#) servirent à faire les PCR inverses pour enlever chaque gène du système *prtCABD*.

8.3.2 Mutation de l'opéron *prtCABD*

La méthode de Datsenko et Wanner, basée sur le remplacement du gène, ou des gènes dans ce cas-ci, par une cassette de résistance à un antibiotique, permet la mutation de l'opéron dans la souche sauvage QT598 ([Datsenko et Wanner, 2000](#)). Le plasmide pKD3, codant une cassette de résistance au chloramphénicol, sert de matrice pour l'amplification PCR avec des amorces dont les extrémités 3' sont homologues aux séquences retrouvées à côté des gènes cibles, et les recombinaisons λ Red produites par le plasmide pKD46 permettent de faire la recombinaison homologe. La sélection se fait sur milieu LB avec 30 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol à 37°C afin de perdre le plasmide pKD46 qui est thermosensible. Les amorces CMD1911 et CMD1912 servent à l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3.

8.3.3 Complémentation de la souche $\Delta\text{prtCABD}$

La complémentation de la souche QT598 $\Delta\text{prtCABD}$ fut effectuée par l'intégration simple copie au site attTn7 du chromosome suite à une conjugaison. Cette méthode de complémentation simple copie fut développée par notre laboratoire ([Crepin et al., 2012a](#)). Le système *prtCABD* fut cloné dans le vecteur suicide pGp-Tn7-Gm (transposon Tn7) et transformé dans la souche donneuse MGN617 auxotrophe pour l'acide mesodiaminopimélique (DAP). Le fragment *prtCABD* est cloné à proximité de la cassette de résistance à la gentamicine, et ces deux systèmes se retrouvent entre deux sites Tn7. La souche donneuse MGN617 put ensuite transférer le plasmide par conjugaison à la souche receveuse QT598 $\Delta\text{prtCABD}$ ayant un plasmide thermosensible codant les transposases (pSTNSK-Tp). Les transposases intègrent le fragment d'ADN *prtCABD* dans le site attTn7 du chromosome de la souche receveuse. Suite à la conjugaison, les bactéries sont sélectionnées sur un milieu ne contenant pas de DAP, prévenant la souche donneuse MGN617 de pousser, ainsi qu'en présence de gentamicine (15 $\mu\text{g/ml}$) pour sélectionner le système *prtCABD*. Le plasmide pGp-Tn7-Gm contient la résistance à la gentamicine et à l'ampicilline, mais lors de l'intégration du

fragment dans le chromosome, la résistance à l'ampicilline est perdue. Une incubation à 37°C permet de perdre le plasmide des transposases, et ceci est aussi confirmé par la sensibilité de la bactérie à la triméthoprimine. Le vecteur suicide pGp-Tn7-Gm contient une origine de répllication *pir* dépendante et seule une souche codant la protéine Pi peut répliquer et maintenir le plasmide. La souche QT598 ne possède pas la protéine Pi et doit intégrer le fragment *prtCABD* avec la cassette de résistance à la gentamicine afin de survivre sur un milieu contenant cet antibiotique. Toutefois, il arrive que le plasmide au complet soit intégré, mais ces clones sont éliminés lors de la sélection des clones sensible à l'ampicilline.

8.3.4 Fusion promoteur *prt* avec les gènes *luxCDABE*

Les amorces CMD2049 et CMD2050 servirent à l'amplification du promoteur *prt* et celui-ci fut cloné dans le vecteur pGp-Tn7-Cm et transformé dans la souche DH5-alpha lambda *pir*. Ce plasmide fut ensuite transféré à la souche donneuse MGN617 auxotrophe pour DAP afin de faire une conjugaison avec la souche QT598 sauvage et intégrer la fusion entre le promoteur *prt* et les gènes *luxCDABE* au site *attTn7* du chromosome de la souche receveuse QT598 sauvage. Le même protocole de conjugaison décrit plus haut fut suivi.

8.4 Précipitation au TCA et migration sur gel

8.4.1 Surnageant

Pour visualiser les protéines du surnageant, un millilitre d'une culture de 18 heures fut centrifugé et 900 µl de surnageant fut ajouté à 100 µl de TCA 100% et incubé sur glace pendant 30 minutes, suivi d'une centrifugation à vitesse maximale pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant fut jetée et le culot lavé deux fois, d'abord avec 500 µl de TE pH 12 et ensuite avec 500 µl de TE pH 8. Le culot fut suspendu dans 200 µl de TE pH 8 et 100 µl de tampon de chargement 3X, et le tout chauffé pendant 5 minutes dans de l'eau à 100°C, dernière étape de préparation de l'échantillon pour la migration sur gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie. Le

séquençage de la bande protéique fut effectué par le service d'analyse de protéines par spectrométrie de masse.

8.4.2 Culot

Le culot d'un millilitre d'une culture O/N centrifugé reçut un volume de la solution Bugbuster déterminé suite à la lecture de la densité optique de la culture O/N et comparaison avec une courbe standard. Ceci fut suivi par une incubation de 15 minutes à température pièce et d'une centrifugation à température pièce à vitesse maximale pendant 5 minutes. On ajouta un volume de tampon de chargement 3X équivalent à la moitié du volume de Bugbuster ajouté précédemment au surnageant récupéré suite à la centrifugation. Cet échantillon fut ensuite chauffé et migré sur gel comme indiqué précédemment.

8.5 Test d'hémolyse sur gélose sang

Des géloses 5% de sang de moutons auxquelles on rajouta les antibiotiques appropriés et 10 mM de calcium furent inoculées à partir d'une colonie se trouvant sur gélose LB avec antibiotique. Les géloses sang furent incubées à 37°C pendant 18 heures.

Les géloses de sang d'humains furent préparées en ajoutant 5% de sang humain et 10 mM de calcium à du milieu agar TSA. Une fois solidifiées, les antibiotiques appropriés furent rajoutés et les géloses inoculées avec les souches à tester à partir d'une colonie se trouvant sur gélose LB avec antibiotique. Les géloses sang furent incubées à 37°C pendant 18 heures. Le sang d'humain provint de l'INRS-IAF.

8.6 Test d'hémolyse en liquide

Le sang de poulet et d'humain utilisé pour ces tests provint de l'INRS-IAF. La solution de sang dut d'abord être ajustée à 1%. Cette étape consista à ajouter 0.5 ml de sang à 3.5 ml d'eau, suivit d'une centrifugation de 10 minutes à 1000 RPM et de la lecture de la densité optique du surnageant à 545 nm. La valeur obtenue doit se situer à

0.30 ± 0.02. Si la densité optique ne se situe pas dans cette zone, il est nécessaire d'ajuster en conséquence.

Il faut ensuite ajuster la quantité de bactéries d'une culture O/N afin d'avoir une concentration de 5×10^5 bactéries par ml. À cette solution, 0.5 ml de PBS + 10 mM de Ca^{2+} et 1 ml de la solution sanguine de 1% furent ajoutées, et le tout incubé dans un bain-marie à 37°C pour une heure, à la fin de laquelle il fallut ajouter 2 ml de saline froide. Le surnageant fut récolté après une centrifugation de 10 minutes à 1000 RPM et sa densité optique mesurée à 545 nm. Ce protocole fut modifié de celui retrouvé dans l'ouvrage de Harshman ([Harshman, 1988](#)).

8.7 Infection des cellules hôtes *in vitro*

Les fibroblastes aviaires CEC-32 furent cultivés en flasque dans du milieu DMEM (Wisent Inc) avec 10% de SVF (HyClone) et les cellules furent mises en plaque 96 puits (Sarstedt) la journée avant l'infection à une quantité de 5×10^4 cellules par puits. Les monocytes THP1 (provenant du laboratoire du Dr France Daigle) et les cellules urothéliales 5637 (ATCC HTB-9™) furent cultivés dans du milieu RPMI supplémenté (25 mM HEPES, 4mM L-glutamine, 10% SVF, 0.1 mM acides aminés non-essentiels, 1mM sodium pyruvate) (Wisent Inc). Les cellules urothéliales furent mises en plaque 96 puits la veille de l'infection à une quantité de 5×10^4 cellules par puits et les monocytes furent mis en plaque 48 heures avant l'infection à une concentration de 8×10^4 cellules par puits en présence de PMA pour favoriser leur différenciation en macrophages et l'adhérence. Toutes les cellules furent incubées à 37°C et 5% de CO_2 . Les cellules rénales HEK-293 (ATCC CRL-1573™) furent cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF, 10 mM d'HEPES, 1% d'acides aminés non-essentiels et 1 mM de pyruvate de sodium.

Une culture de 5 ml de LB avec antibiotiques fut inoculée avec une colonie provenant d'une gélose LB avec antibiotique fraîche, où l'isolement datait d'au plus une semaine et incubée à 37°C avec agitation pour 18-24 heures. Le matin, la densité optique à 600 nm fut mesurée et la concentration bactérienne déterminée grâce à une courbe de croissance préétablie, représentée dans la [figure 17](#). Un millilitre de culture

fut centrifugé dans une centrifugeuse de microtube à 1.5 RCF pendant 6 minutes, le surnageant décanté et le culot repris dans un volume équivalent de milieu de culture cellulaire (DMEM ou RPMI). Reprendre le culot dans le même volume permet de maintenir la même concentration de bactéries par ml. Il est dorénavant possible de diluer cette solution bactérienne afin d'obtenir une MOI de 10 :1, soit 10 bactéries par cellule eucaryote.

Ensuite, le milieu de culture fut enlevé de la plaque 96 puits et les cellules lavées avec du HBSS (Wisent Inc), une solution de sel, et la plaque fut inoculée avec 200 µl de bactéries. Suite à une centrifugation de la plaque à 200 RCF pendant 5 minutes, elle fut incubée à 37°C et 5% de CO₂ pour 3 heures. Les cellules furent ensuite lavées trois fois au PBS et colorées au Giemsa en suivant le protocole du manufacturier (Fisher Scientific) et visualisées au microscope.

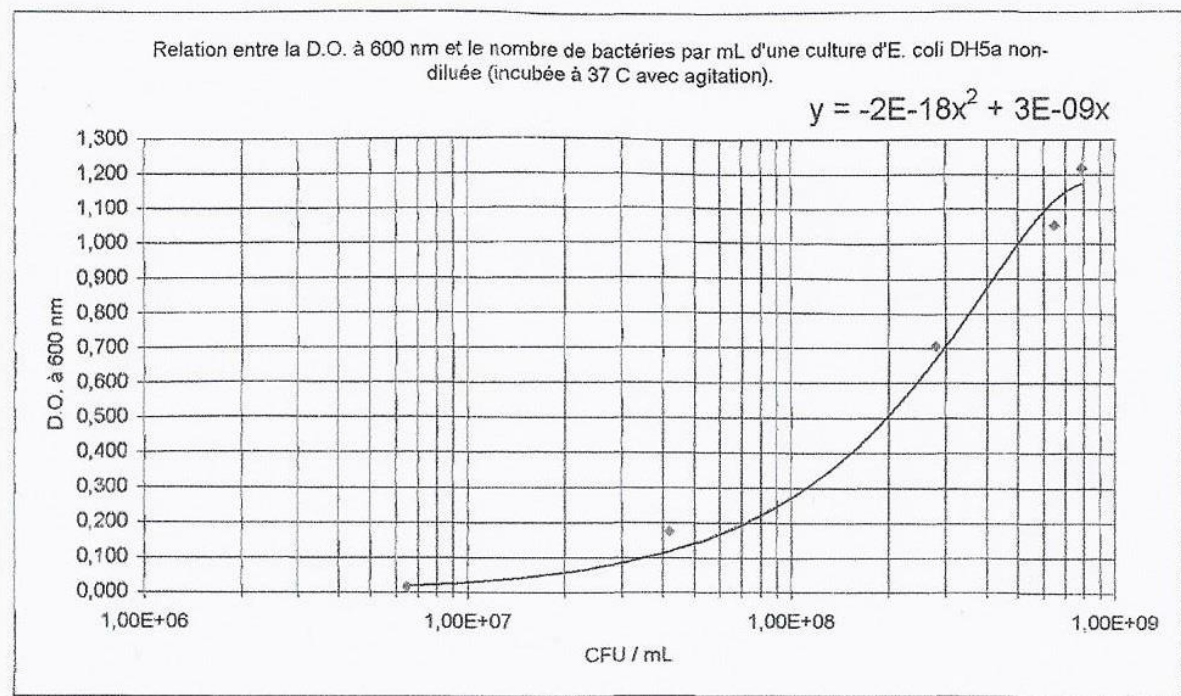


Figure 17 : Courbe de croissance utilisée lors des infections *in vitro*

8.8 Infection urinaire chez la souris

Le protocole animal utilisé fut approuvé par le comité éthique de l'INRS-IAF et se base sur le protocole animal décrit par Hagberg et al en 1983 ([Hagberg et al., 1983](#); [Crepin et al., 2012b](#)). L'infection du tractus urinaire des souris CBA/J de 5-6 semaines fut effectuée en coinfection entre la souche QT598 sauvage et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ à un ratio de 1 :1. Une préculture O/N de 5 ml de LB avec antibiotiques à 37°C inoculée à partir d'une colonie sur gélose fraîche servit à partir une deuxième préculture la veille de l'infection, et ce dans les mêmes conditions, à l'exception du temps, où cette deuxième préculture fut incubée pour environ 6 heures. Un volume de 100µl de la deuxième préculture fut ajouté à 55 ml de LB sans antibiotiques pour partir la culture O/N qui servit à l'infection. Le jour de l'infection, les deux souches furent mélangées ensemble, concentrées par centrifugation et maintenues sur glace jusqu'à l'infection. Un échantillon fut prélevé et des dilutions furent étalées sur gélose MacConkey afin d'effectuer un décompte bactérien pour s'assurer qu'un ratio de 1 :1 fut bien obtenu, puisqu'une différence dans la quantité de chacune des souches lors de l'inoculum peut causer une variation des résultats. Les souris, anesthésiées avec de l'isofluorane, reçurent l'inoculum de 20 µl, l'équivalent de 5×10^9 bactéries, directement dans la vessie par le biais d'un cathéter. L'infection dura 48 heures. Les souris furent euthanasiées par CO₂ suivit d'un pneumothorax double. La vessie et les deux reins furent récupérés et broyés dans un tampon de BSG (1.5 M de NaCl, 20 mM de KH₂PO₄, 50 mM de Na₂HPO₄ et 0.1% de gélatine) d'un volume équivalent à 4 fois la masse de l'organe. Les organes broyés furent ensuite dilués et étalés sur gélose MacConkey. Les géloses furent incubées à 37°C pour la nuit afin d'effectuer un décompte bactérien le lendemain. Un test t de Wilcoxon servit de tests statistiques pour l'analyse des résultats des infections chez les souris (test statistique effectué à partir du logiciel GraphPad Prism version 4.02 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Le même protocole fut utilisé pour la coinfection entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complémentée avec le système *prtCABD*.

Les monoinfections du tractus urinaire de souris suivit le même protocole que la coinfection, à l'exception que les deux souches utilisées, soit la souche QT598 sauvage et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ lui manquant le système *prtCABD* ne furent pas mélangées avant l'infection. La moitié des souris reçut l'inoculum ayant la souche QT598 sauvage et l'autre moitié des souris reçurent l'inoculum ayant la souche QT598 $\Delta prtCABD$.

8.9 Régulation

8.9.1 Régulation par HN-S

Les souches BW25112 sauvage et BW25113 Δhns furent inoculées sur une gélose de sang humain supplémentée avec 10 mM de calcium et incubée à 37°C pendant la nuit.

8.9.2 Expression du système par la fusion lux

L'expérience fut effectuée dans une plaque 96 puits. Une culture de 18 heures à 37°C fut diluée 1 :100 dans un volume total de 200µl avec le milieu approprié, soit LB, LB avec 10 µM de fer ou LB avec 100µM de dipyridyl, un chélateur de fer. La plaque 96 puits fut ensuite incubée dans un lecteur de plaque à luminescence à différentes températures, 30°C, 37°C ou 42°C pour une période de 24 heures, avec une mesure s'effectuant toutes les 15 minutes.

RÉSULTATS

9.1 Phylogénie

Nous avons d'abord déterminé l'identité en acides aminés entre les protéines codées par les gènes *prtCABD* de la souche QT598 et d'autres protéines RTX identifiées par des comparaisons BLASTp. La séquence nucléotidique des gènes fut traduite en séquence protéique et soumit dans le logiciel BLAST de NCBI afin d'identifier des protéines similaires et potentiellement identifier l'origine du système et/ou sa distribution chez d'autres souches d'*E. coli* et d'autres espèces bactériennes ([Altschul et al., 1990](#)).

Tableau 5 : Identité de la protéine PrtC avec d'autres protéines RTX par BLASTp

Protéine homologue	Souche	% de couverture	% d'identité	#gi
RtxC	<i>E. coli</i> (UMEA 3489-1)	100	100	545242882
RtxC	<i>E. coli</i> (UMEA 3585-1)	100	99	545289535
RtxC	<i>E. coli</i> (UMEA 3703-1)	100	98	545295781
LtxC	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	95	58	491745679
RtxC	<i>Cronobacter malonaticus</i>	94	84	696398515
ApxIIIC	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	93	54	696127255
LktC	<i>Mannheimia haemolytica</i>	92	49	757540641
EhxC	<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL933)	91	60	3822161
HlyC	<i>E. coli</i> CFT073	91	57	26109812

ApxIC	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	91	56	1477456
ApxIIC	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	91	48	746706112

Au niveau de la protéine PrtC, codant pour l'acyltransférase nécessaire à l'activation de la toxine, des protéines RtxC prédites de trois souches UPEC (3489-1, 3585-1 et 3703-1) qui possèdent très peu de variations avec PrtC furent identifiées. Les protéines ayant une similarité avec PrtC sont présentées dans le [tableau 5](#). Sur 100% de couverture de la séquence de 169 acides aminés, la souche UMEA 3489-1 est identique à la protéine de la souche APEC QT598, et les souches UMEA 3585-1 et 3703-1 suivent de très près à 99% et 98% d'identité, respectivement. Ces analyses indiquent que le système RTX Prt est présent dans les génomes de certaines souches d'*E. coli* pathogènes causant des infections urinaires chez les humains. Le pourcentage d'identité de PrtC avec d'autres membres de la famille indique que la protéine partage plus d'identité avec des protéines des systèmes RTX d'autres espèces qu'avec les systèmes déjà caractérisés chez des *E. coli* pathogènes (les systèmes Hly et Ehx). Par exemple, un orthologue chez *C. malonaticus* partage 84% d'identité sur 94% de la séquence. Les orthologues de PrtC des autres souches d'*E. coli* pathogènes, soit la souche EHEC O157 :H7 qui code pour EhxC et la souche UPEC CFT073 qui code pour HlyC, démontre 60% et 57% d'identité sur 91% de la séquence. D'autres protéines RTX démontrant des identités à PrtC incluent les toxines Apx et Ltk provenant des membres de la famille des Pasteurellaceae (*A. pleuropneumoniae* et *M. haemolytica*).

Les résultats du logiciel BLAST servirent à produire un arbre phylogénétique dans le logiciel MEGA 6 afin de mieux observer les liens phylogénétiques des protéines. La [figure 18](#) montre l'arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtC.

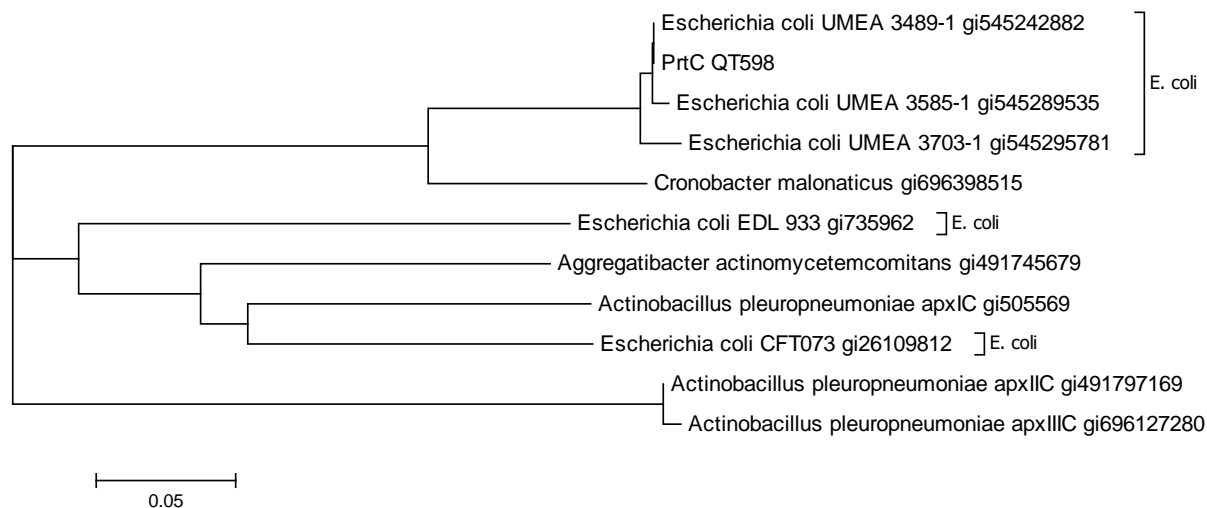


Figure 18 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtC.

Tableau 6 : Identité de la protéine PrtA avec d'autres protéines RTX par BLASTp

Protéine homologue	Souche	% de couverture	% d'identité	#gi
RtxA	<i>E. coli</i> (UMEA 3489-1)	100	99	566140648
RtxA	<i>E. coli</i> (UMEA 3585-1)	100	99	545289536
RtxA	<i>E. coli</i> (UMEA 3703-1)	100	99	545289536
RtxA	<i>Cronobacter malonaticus</i>	100	91	696398517
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	96	41	255959000
LktA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	93	41	11762044
RtxA	<i>Kingella kingae</i>	93	40	740495296
EhxA	<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL933)	93	37	3822162

HlyA	<i>E. coli</i> CFT073	93	36	26109813
LtxA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	93	36	38645
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	90	36	302648069
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	87	38	18026877

Les protéines RTX des trois souches UMEA se retrouvent encore dans le haut du [tableau 6](#), avec 99% de similarité à la protéine PrtA, qui est la toxine elle-même. De plus, la protéine RtxA de *Cronobacter malonaticus* démontre une identité élevée de 91% sur 100% de la séquence. Par contre, EhxA d'*E. coli* O157 :H7 et HlyA de CFT073 démontrent seulement 37% et 36% d'identité, respectivement, sur 93% de la séquence. D'autres protéines provenant de différentes espèces partagent de 36% à 41% d'identité avec 87% à 93% de couverture de la séquence complète de PrtA. La [figure 19](#) montre l'arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtA.

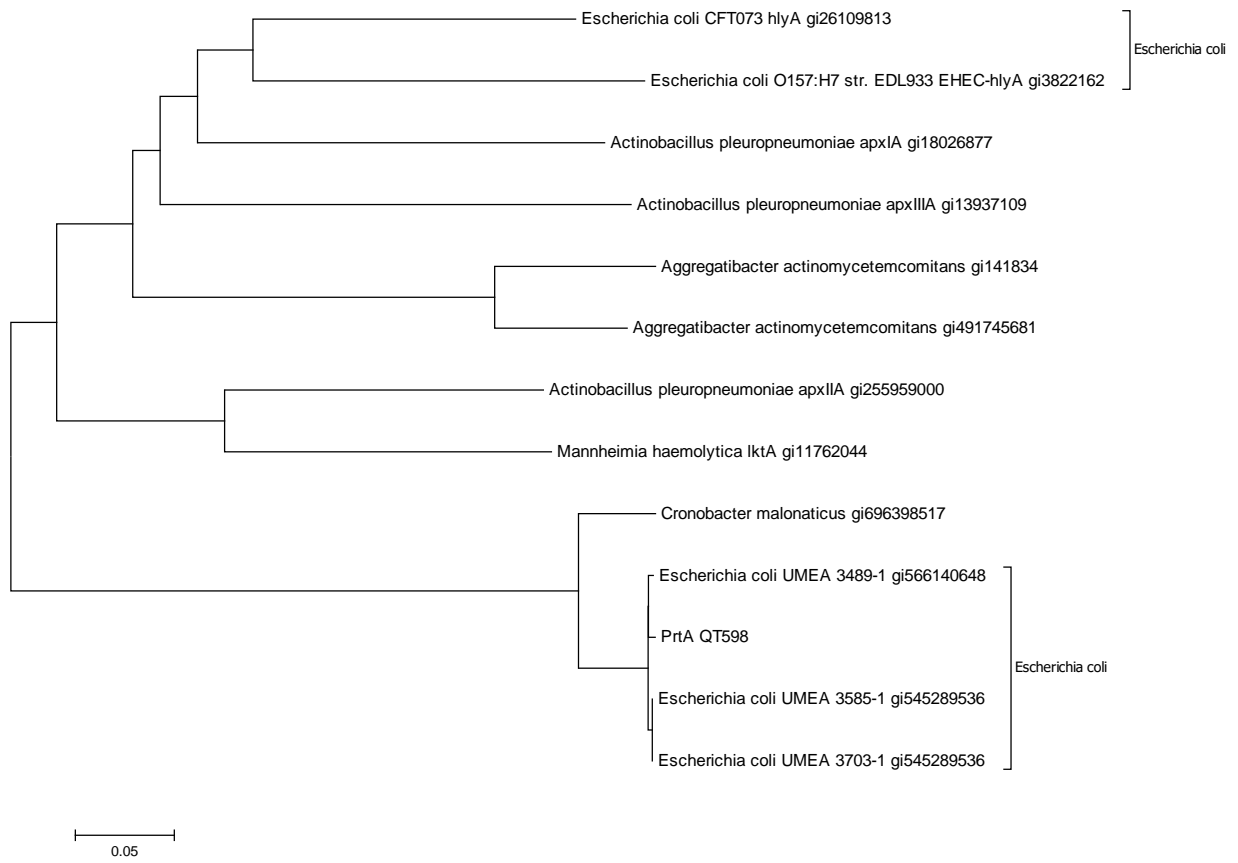


Figure 19 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtA.

Tableau 7 : Identité de la protéine PrtB avec d'autres protéines RTX par BLASTp

Protéine homologue	Souche	% de couverture	% d'identité	#gi
RtxB	<i>E. coli</i> (UMEA 3489-1)	100	99	565520811
RtxB	<i>E. coli</i> (UMEA 3585-1)	100	99	535795391
RtxB	<i>E. coli</i> (UMEA 3703-1)	100	99	535851956
RtxB	<i>Cronobacter malonaticus</i>	100	96	696398520
LtxB	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	99	71	644292092
ApxIB	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	99	70	696127229
ApxIIIB	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	99	69	696127331
HlyB	<i>E. coli</i> CFT073	99	68	26109816
LktB	<i>Mannheimia haemolytica</i>	99	68	15987896
EhxB	<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL933)	99	66	3822163

Les protéines ayant une similarité avec PrtB sont présentées dans le [tableau 7](#). Les trois souches UMEA maintiennent un pourcentage d'identité de 99% pour la protéine PrtB nécessaire à la sécrétion suivi de 96% par *Cronobacter malonaticus*. Les autres espèces ont toutes un niveau de similarité élevée sur 99% de la séquence, et la protéine HlyB de CFT073 et EhxB d'*E. coli* O157:H7 démontre 68% et 66% d'identité respectivement. La [figure 20](#) montre l'arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtB.

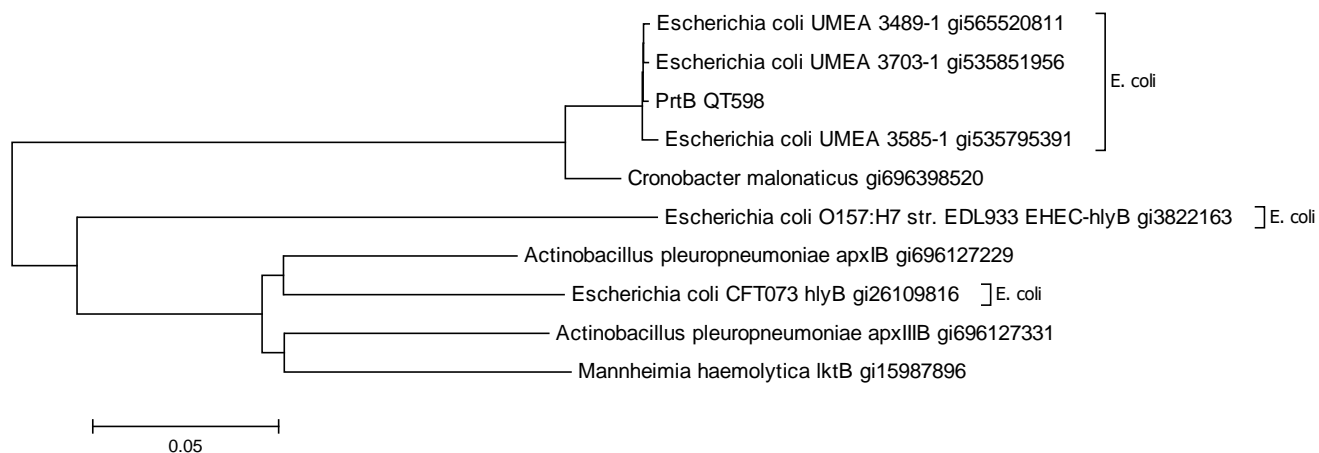


Figure 20 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtB.

Tableau 8 : Identité de la protéine PrtD avec d'autres protéines RTX par BLASTp

Protéine homologue	Souche	% de couverture	% d'identité	#gi
RtxD	<i>E. coli</i> (UMEA 3703-1)	99	99	535851955
RtxD	<i>Cronobacter malonaticus</i>	99	86	696398523
LtxD	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	99	47	491745685
HlyD	<i>E. coli</i> CFT073	99	46	26109817
RtxD	<i>E. coli</i> (UMEA 3585-1)	99	46	535795392
ApxIIID	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	99	46	165876852
ApxID	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	99	44	696127207
LktD	<i>Mannheimia haemolytica</i>	99	44	150515
EhxD	<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL933)	99	39	3822164

RtxD	<i>E. coli</i> (UMEA 3489-1)	75	99	565520394
------	------------------------------	----	----	-----------

Les protéines similaires à la protéine PrtD sont présentées dans le [tableau 8](#). Seule la souche UMEA 3703-1 possède une protéine identique à PrtD, l'autre protéine nécessaire à la sécrétion de la toxine, et *Cronobacter malonaticus* est homologue avec 86% d'identité. D'autres protéines provenant des bactéries telles qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. pleuropneumoniae* et *M. haemolytica* démontrent de 44% à 47% d'identité. HlyD de CFT073 ainsi que la protéine d'*E. coli* UMEA 3585-1 démontrent 46% d'identité et la protéine EhxD d'*E. coli* O157 :H7 partage 39% d'identité. La souche UMEA 3489-1 a une protéine avec une identité de 99%, mais seulement sur 75% de la séquence de PrtD. La [figure 21](#) montre l'arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtD.

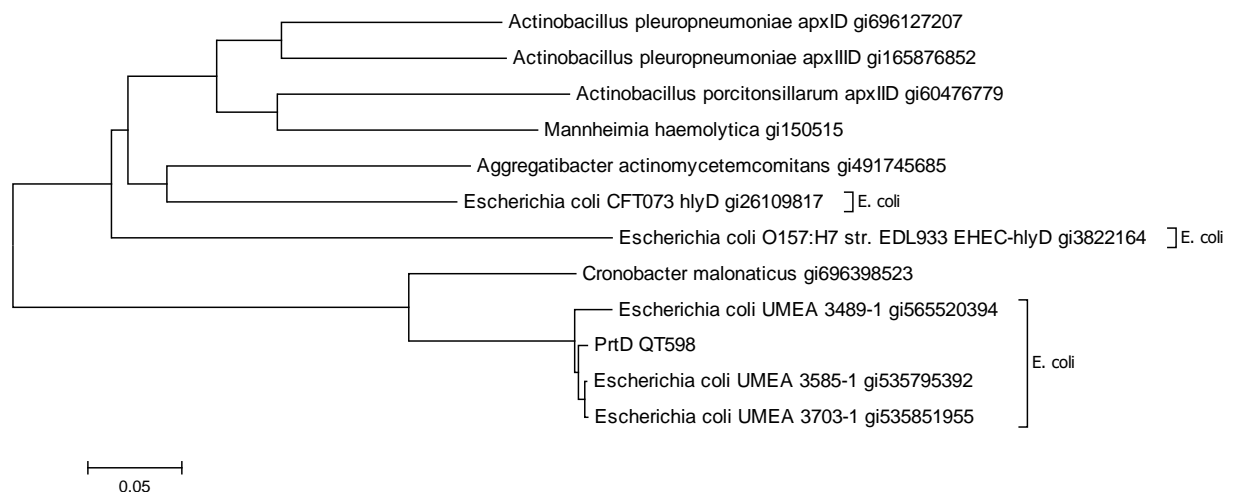


Figure 21 : Arbre phylogénétique des protéines démontrant une homologie avec PrtD.

9.2 Visualisation sur gel et séquençage

Une fois le système cloné dans le plasmide pUCmT, la souche contenant le plasmide pIJ479 fut inoculée, à partir d'une colonie sur gélose LB et 100 µg/ml d'ampicilline, dans 5 ml de LB avec 100 µg/ml d'ampicilline et incubée à 37°C pour la nuit. Un millilitre de cette culture fut centrifugé, le surnageant filtré et 900 µl du surnageant filtré fut précipité au TCA et concentré dans un volume final de 300 µl. Le tout fut migré sur gel SDS PAGE afin de visualiser la toxine PrtA, dont la masse moléculaire théorique est de 91.73 kDa.

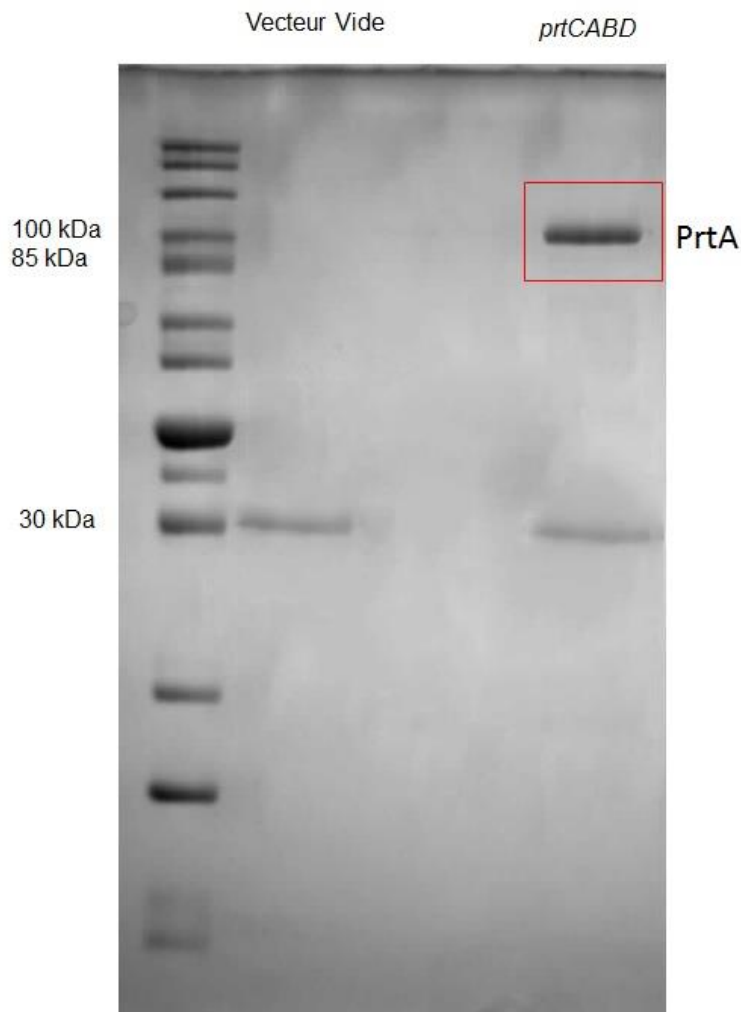


Figure 22 : Visualisation de la protéine PrtA sur gel SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie suite à une précipitation au TCA. Le surnageant d'une souche d'*E. coli* contenant le même plasmide, mais sans insertion fut aussi précipité et migré.

La [figure 22](#) montre le gel SDS-PAGE de la protéine colorée au bleu de Coomassie. Nous observons une bande entre 85 et 100 kDa, ce qui semble correspondre à la protéine recherchée. La bande fut ensuite découpée et séquencée afin de s'assurer de l'identité de la protéine. Une deuxième bande est observable à 30 kDa et celle-ci correspond à la protéine conférant la résistance à l'ampicilline, marqueur de sélection du plasmide dans lequel le système *prtCABD* est cloné. Cette bande est aussi présente dans un extrait du surnageant provenant d'une souche d'*E. coli* ayant le même plasmide, mais sans insertion. De plus, l'analyse de la séquence du marqueur de résistance indique que la protéine de résistance devrait avoir une masse moléculaire de 31.6 kDa, ce qui correspond à ce qui est observable sur le gel de la [figure 22](#) ([Altschul et al., 1990](#)) La [figure 23](#) montre le résultat du séquençage. Les peptides en rouges possèdent une identité à 100% avec la séquence de PrtA, tandis que les peptides en noirs ont quelques différences avec la séquence de PrtA. Avec la similarité élevée des peptides, il est possible de conclure que la protéine isolée correspond à la toxine PrtA.

[gi|545289536](#) Mass: 91567 Score: 972 Matches: 24(10) Sequences: 16(8) emPAI: 0.46
 hypothetical protein [Escherichia coli]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide	
<input checked="" type="checkbox"/> 60	482.9019	963.7893	963.4695	0.3198	0	33	1.1e+02	1	U	K.AAAGVEMTSK.I	
<input checked="" type="checkbox"/> 81	533.2859	1064.5573	1064.5536	0.0037	0	(43)		11	7	U	K.MAVSSVGSISK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 82	533.6708	1065.3270	1064.5536	0.7734	0	(52)		1.3	1	U	K.MAVSSVGSISK.F
<input checked="" type="checkbox"/> 83	533.7279	1065.4413	1064.5536	0.8878	0	62	0.15	1	U	K.MAVSSVGSISK.F	
<input checked="" type="checkbox"/> 125	637.3340	1272.6535	1271.5856	1.0679	0	18	3.8e+03	5	U	R.YAAFMEENLGK.L	
<input checked="" type="checkbox"/> 147	695.9503	1389.8860	1389.6987	0.1873	0	76	0.0047	1	U	R.LDDVEGSITLNSK.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 148	696.0889	1390.1633	1389.6987	0.4646	0	(24)	8.4e+02	6	U	R.LDDVEGSITLNSK.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 150	696.3896	1390.7647	1389.6987	1.0660	0	(36)		53	2	U	R.LDDVEGSITLNSK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 151	701.3969	1400.7792	1400.7875	-0.0083	0	(61)	0.18	1	U	K.DAIAVAGGVLTVTSK.G	
<input checked="" type="checkbox"/> 152	701.4430	1400.8714	1400.7875	0.0839	0	(68)	0.032	1	U	K.DAIAVAGGVLTVTSK.G	
<input checked="" type="checkbox"/> 153	701.5129	1401.0113	1400.7875	0.2238	0	80	0.0019	1	U	K.DAIAVAGGVLTVTSK.G	
<input checked="" type="checkbox"/> 164	740.0150	1478.0154	1477.8028	0.2126	0	72	0.012	1	U	K.GVAISAEYLSLLK.K	
<input checked="" type="checkbox"/> 166	759.4398	1516.8651	1516.8348	0.0303	0	65	0.056	1	U	K.VESITGDGLVISSK.K	
<input checked="" type="checkbox"/> 176	795.8518	1589.6890	1589.7362	-0.0472	0	102	1.1e-05	1	U	K.YGYSGDELLANFNK.E	
<input checked="" type="checkbox"/> 181	536.7114	1607.1122	1605.8977	1.2145	1	46	4.4	1	U	K.GVAISAEYLSLLKK.H	
<input checked="" type="checkbox"/> 182	804.9591	1607.9037	1607.7904	0.1133	0	83	0.00086	1	U	K.GNTSTIADFSNVVQR.I	
<input checked="" type="checkbox"/> 193	563.0298	1686.0676	1685.7897	0.2779	0	74	0.0067	1	U	K.SVIEGEGFDTVSYAR.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 194	844.2696	1686.5247	1685.7897	0.7350	0	(29)	2.3e+02	2	U	K.SVIEGEGFDTVSYAR.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 195	844.3783	1686.7421	1685.7897	0.9524	0	(72)	0.01	1	U	K.SVIEGEGFDTVSYAR.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 203	592.6581	1774.9525	1773.9108	1.0416	1	34	72	1	U	K.EVRLDDVEGSITLNSK.S	
<input checked="" type="checkbox"/> 204	600.4559	1798.3459	1797.9360	0.4099	0	53	0.88	1	U	K.VSEVDKPQIIEEDIGK.F	
<input checked="" type="checkbox"/> 205	900.5340	1799.0534	1799.0153	0.0382	0	100	1.6e-05	1	U	K.LQGVSGLQSVSSVLQGIK.G	
<input checked="" type="checkbox"/> 238	1082.9910	2163.9674	2163.0882	0.8792	0	34	54	1	U	K.SPSQALFTLPLMTPTESR.I	
<input checked="" type="checkbox"/> 263	1315.6039	2629.1932	2629.1873	0.0059	0	48	1.8	1	U	K.IIEQEVHPGQNYFEYGYDSR.Y	

Figure 23 : Peptides obtenus lors du séquençage protéique de la bande obtenue suite à la précipitation au TCA d'un surnageant de la culture de la souche DH5- α contenant le plasmide pIJ479.

Pour vérifier le rôle de chacun des gènes, des surnageants et les culots de cultures O/N des mutants de chaque gène furent précipités au TCA et Bugbuster, respectivement, et migré sur gel SDS-PAGE. Le résultat est présenté dans la [figure 24](#).

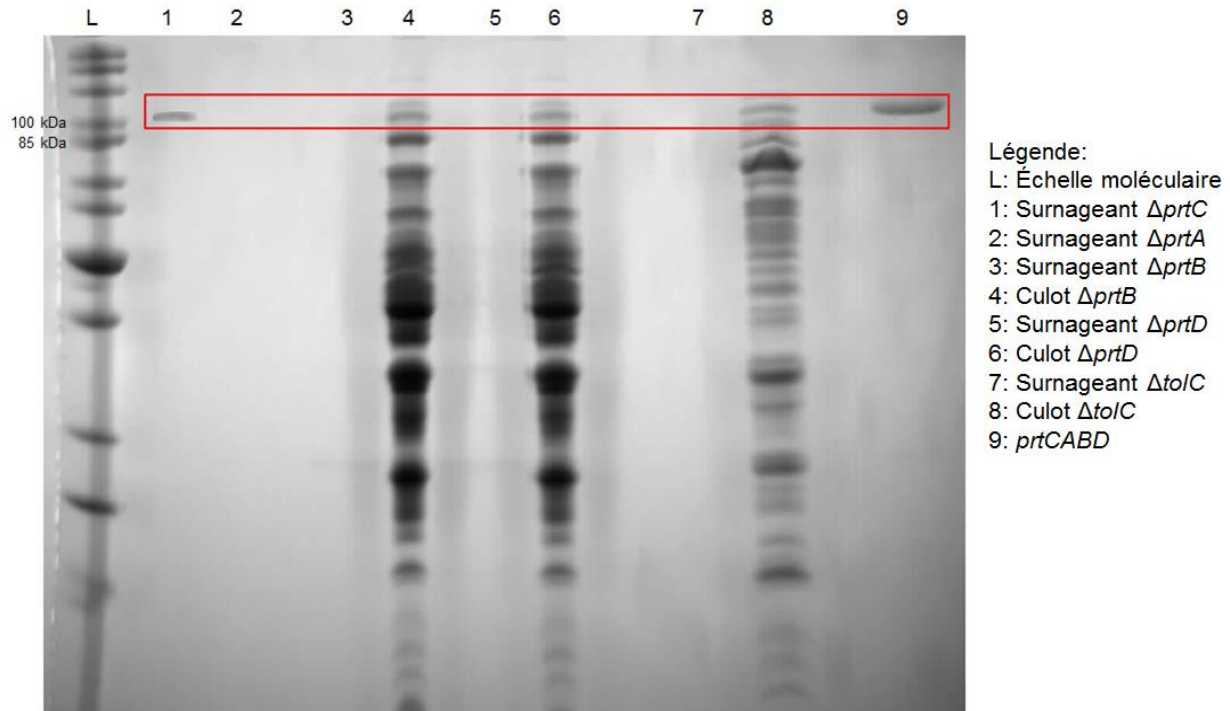


Figure 24 : Gel de polyacrylamide des surnageants et/ou culots (lysats de cellules entières de bactéries) des différents mutants manquant un des gènes *prt*.

La bande qui correspond à la toxine est présente dans le surnageant du mutant $\Delta prtC$ lui manquant l'acyltransférase PrtC et elle est absente dans le surnageant du mutant $\Delta prtA$ lui manquant la toxine PrtA.

Les mutants qui ne possèdent pas les gènes de transport *prtB* et *prtD* n'ont aucun produit correspondant à la bande de PrtA dans leurs surnageants, mais cette bande est visible dans les culots des lysats de cellules bactériennes. Le plasmide pIJ479 fut également cloné dans une souche d'*E. coli* K-12 $\Delta tolC$, une protéine reconnue d'être essentiel à la sécrétion des toxines RTX comme HlyA. Tout comme les mutants manquant *prtB* ou *prtD*, aucun produit correspondant à PrtA ne se retrouve dans le surnageant de la souche $\Delta tolC$, mais cette bande est présente dans le culot du lysat bactérien. Le surnageant de la souche ayant le plasmide pIJ479 est aussi mis sur

gel afin de servir de contrôle positif et aider à identifier la bande recherchée dans les autres puits.

9.3 Hémolyse sur gélose sang

Afin de déterminer si le système Prt est capable de lyser des érythrocytes, il fallait inoculer une gélose sang avec le clone d'*E. coli* K-12 contenant le plasmide pIJ479. L'inoculation des souches contenant des dérivés manquant des gènes *prt* ou la souche K-12 $\Delta tolC$ avec le plasmide pIJ479 sur gélose sang permet de vérifier l'effet de chacune des mutations et sert à concorder les résultats obtenus sur gel SDS-PAGE présenté à la [figure 24](#). Les clones *prtCABD* et *hlyCABD* et les mutants $\Delta prtC$, $\Delta prtA$, $\Delta prtB$, $\Delta prtD$ et $\Delta tolC$ furent inoculés sur gélose de sang de mouton 5% et incubée à 37°C pour la nuit. Les clones *prtCABD* et *hlyCABD* causent la lyse des érythrocytes, visible par la formation d'un halo pâle autour de la strie de bactéries, tandis que les mutants sont incapables de causer la lyse des érythrocytes et ne causent aucune plage pâle autour des bactéries. De plus, la souche d'*E. coli* K-12 avec le vecteur vide (« empty vector »), soit le même vecteur dans lequel les gènes *prtCABD* furent clonés, mais sans insertion, ne causa pas de lyse sur gélose sang.

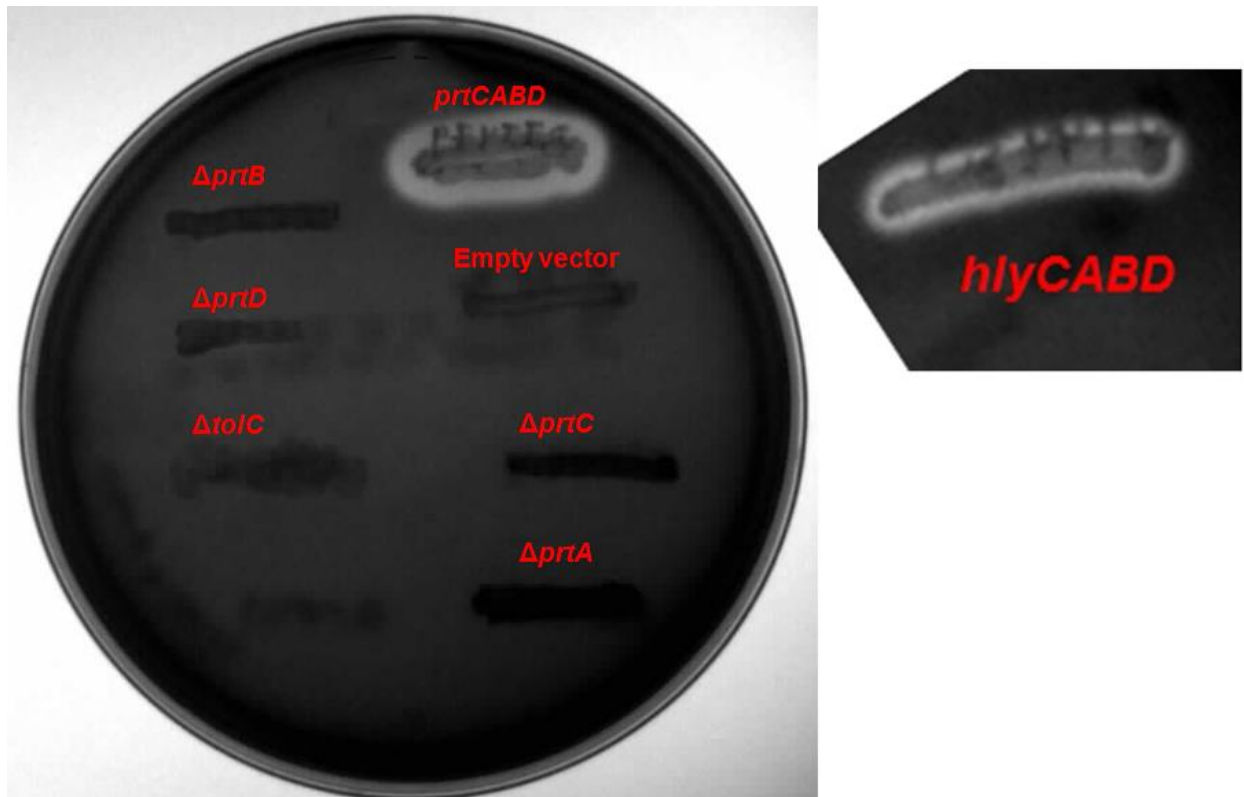


Figure 25 : Hémolyse sur gélose sang de moutons de la souche d'*E. coli* K-12 contenant le plasmide pIJ479, des mutants manquant un des gènes *prt*, de la souche $\Delta toIC$ avec pIJ479 ainsi que la souche d'*E. coli* K-12 ayant le système de la toxine HlyA. La gélose est supplémentée avec 10 mM de calcium.

Puisqu'une lyse des globules rouges de moutons est observable, nous avons décidé d'évaluer la capacité de la toxine de lyser des érythrocytes humains sur gélose. Une gélose de sang d'humain 5% fut préparée en ajoutant du sang d'humain à une gélose TSA ainsi que 10 mM de calcium. Une strie de chacun des clones et mutants de l'opéron *prtCABD* ainsi que la souche K-12 $\Delta toIC$ avec le plasmide pIJ479 furent inoculées sur la gélose sang d'humain 5% et incubée à 37°C pour la nuit. Seul le clone *prtCABD* causa la lyse des érythrocytes humains, confirmée par le halo pâle autour de la strie bactérienne, observable seulement pour ce clone dans la [figure 26](#).

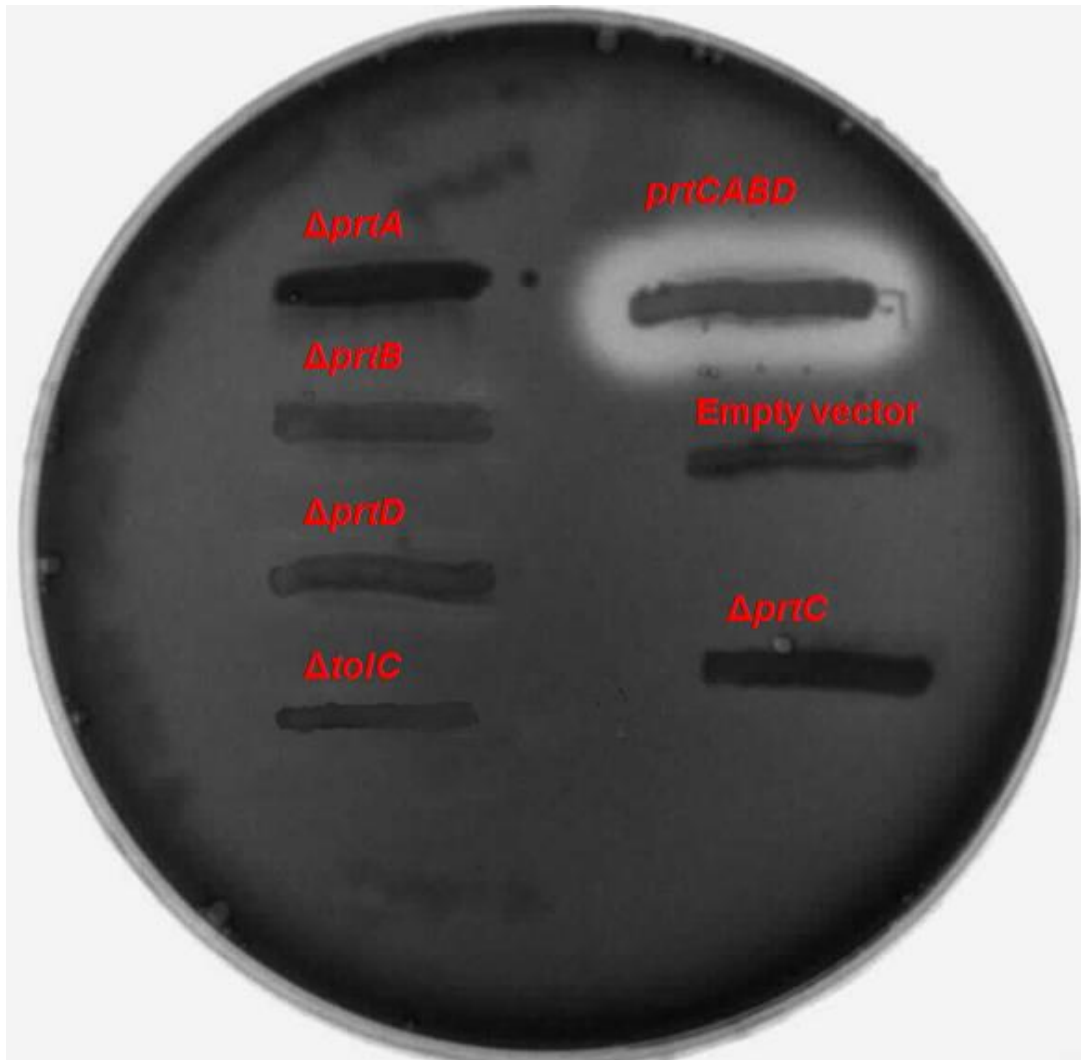


Figure 26 : Hémolyse sur gélose sang humain de la souche d'*E. coli* K-12 contenant le plasmide pIJ479, des mutants manquant un des gènes *prt* et de la souche $\Delta tolC$ avec pIJ479. La gélose est supplémentée avec 10 mM de calcium.

9.4 Hémolyse en sang liquide

Le test d'hémolyse sur gélose sang est effectué sur une longue période de temps et le résultat positif peut être due à la forte concentration de toxine relâchée durant la période d'incubation. Il fut donc décidé d'effectuer le test de lyse en milieu liquide en utilisant du sang d'humain 1%. L'incubation à 37°C fut pour une période d'une heure et la souche d'*E. coli* K-12 ayant le système *hlyCABD* servi de contrôle positif et la saline de contrôle négatif. Seul le contrôle positif causa la lyse des érythrocytes humains.

Étant donné que nous avons du sang de groupe A et de groupe O sous la main, la décision fut de tester les deux groupes sanguins. Le test ne fut effectué qu'une seule fois et c'est pour cela qu'il n'y a pas de barres d'erreurs dans le graphique présenté à la [figure 27](#).

9.4.1 Sang humain

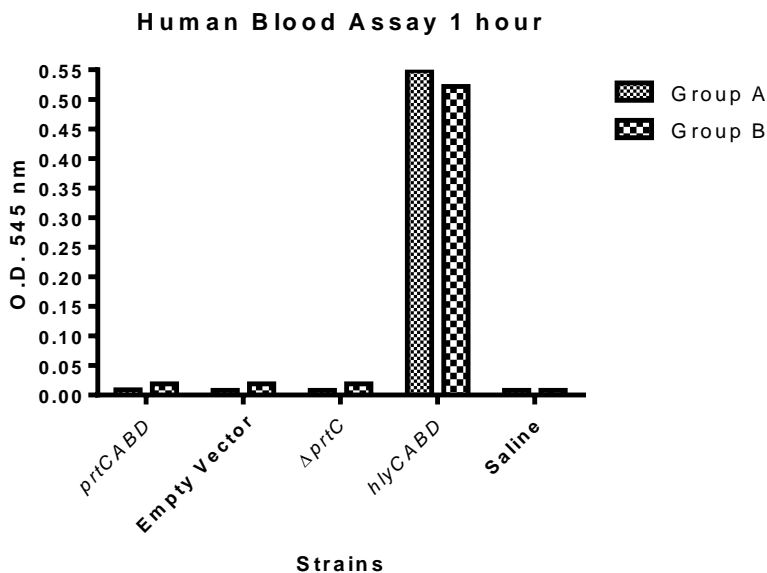


Figure 27: Graphique de la lyse des érythrocytes humains du groupe A et du groupe O après 1 heure d'incubation à 37°C.

Le résultat négatif pour le test en sang liquide nous amena à penser que ce résultat était un faux négatif causé par la courte période d'incubation. Après tout, EhxA d'*E. coli* O157 :H7 nécessite une plus longue période d'incubation que la toxine HlyA avant d'observer une lyse des globules rouges ([Bielaszewska et al., 2014](#)). Le temps d'incubation fut donc augmenté à 4 heures afin d'avoir une période d'incubation assez longue pour permettre à la toxine PrtA de faire son effet. Encore une fois, la souche d'*E. coli* K-12 codant pour le système *hlyCABD* sert de contrôle positif, et la saline sert de contrôle négatif. La [figure 28](#) montre le résultat de cette expérience, où les souches d'*E. coli* K-12 codant pour le système *prtCABD* ou *hlyCABD* causent la lyse des érythrocytes. Le vecteur vide causa une légère hémolyse, mais très peu comparé à la

lyse des érythrocytes causée par les clones *prtCABD* et *hlyCABD*. Le même résultat que pour la souche avec le vecteur vide est observable pour la souche d'*E. coli* K-12 Δ *prtC* et la saline. Un test t de Student fut utilisé pour l'analyse statistique (test statistique effectué à partir du logiciel GraphPad Prism version 4.02 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

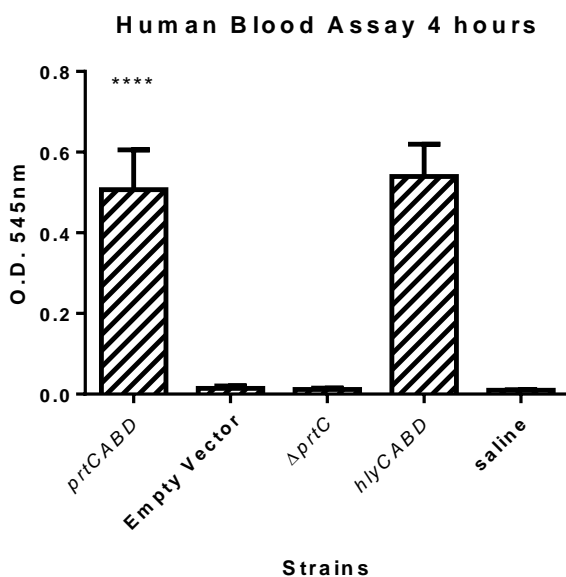


Figure 28: Graphique de la lyse des érythrocytes humains après une incubation de 4 heures à 37°C.

9.4.2 Sang aviaire

Étant donné la lyse des érythrocytes de moutons sur gélose sang, nous avons décidé de tester la lyse des érythrocytes aviaires en milieu liquide, puisqu'après tout, la souche QT598 fut isolée suite à une infection de dinde. Étant donné que du sang de dinde ne pouvait être obtenu, nous nous sommes contentés du sang de poulet. À la [figure 29](#), il est possible d'observer que seul le clone *hlyCABD* causa la lyse des globules rouges, les autres souches utilisées ayant une lyse équivalente à la saline, servant de contrôle négatif. Ce test fut effectué une seule fois et il n'y a donc pas de barres d'erreurs. Nous n'avions pas réussi à obtenir du sang de poulet pour faire le test de nouveau, mais il sera important de l'effectuer en triplicata afin de pouvoir effectuer

des tests statistiques. Le paramètre qu'il faudrait aussi changer est le temps d'incubation, et l'augmenter à 4 heures, tout comme le test avec le sang humain.

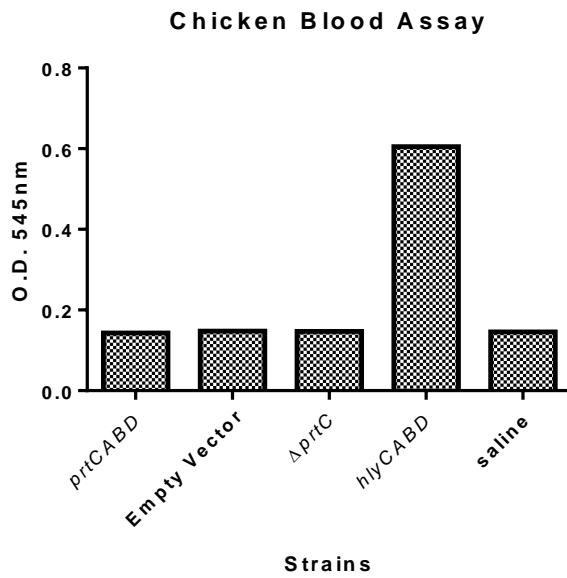


Figure 29: Graphique de la lyse des érythrocytes aviaires.

9.5 Infection de cellules hôtes *in vitro*

9.5.1 Fibroblastes aviaires et surnageant

Puisque la toxine est sécrétée dans le surnageant, celui d'une culture de 18 heures fut filtré, dilué à 50% dans du PBS avec 10 mM de calcium et ajouté à des fibroblastes aviaires en plaque 96 puits, avec la souche d'*E. coli* K-12 ayant le système *hlyCABD* servant de contrôle positif. Le test fut effectué sur une période de trois heures. Des fibroblastes aviaires furent choisis puisque la toxine provient d'une souche APEC et il est connu que HlyA est capable de lyser des fibroblastes ([Thomas et al., 2014](#)). Aucune lyse de cellules n'est observable, et ce, même pour le témoin positif, tel que démontré dans la [figure 30](#). Les toxines RTX sont connues pour être dépendantes du calcium et celui-ci est important afin que la toxine adopte sa conformation active, alors une concentration finale de 10 mM de calcium fut rajouté au milieu de culture durant l'incubation ainsi qu'après filtration du surnageant, en espérant de stabiliser la toxine. Ceci fut en vain puisque les fibroblastes n'ont toujours pas été lysés (résultat non montré). Dans toutes les conditions, le temps d'incubation était d'abord de trois heures avec une vérification aux heures. Le temps fut ensuite augmenté à six heures et ensuite pour toute la nuit. Une incubation pour la nuit cause la lyse des fibroblastes dans toutes les conditions, même lorsque du LB stérile, dilué à 50% avec du PBS-calcium, est utilisé au lieu d'un surnageant, puisque ce milieu n'est pas idéal pour la culture de cellules eucaryotes.

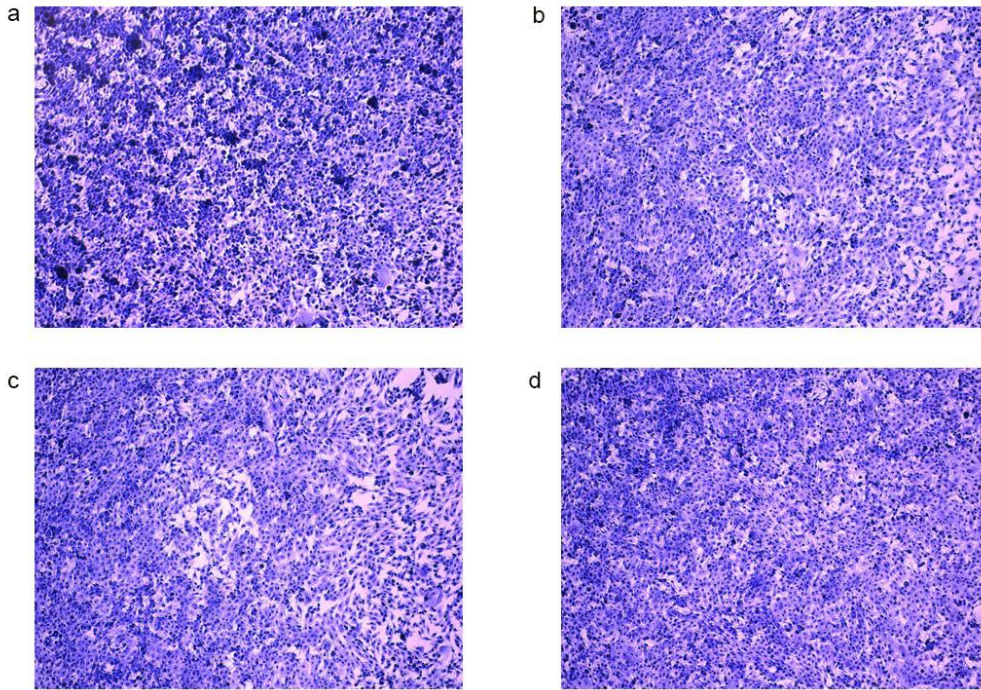


Figure 30 : Interaction entre les fibroblastes aviaires et des surnageants pendant une durée de 3 heures. a : cellules seules; b : plasmide vide; c : *prtCABD*; d : *hlyCABD*

9.5.2 Interactions bactéries-cellules

Le manque de succès avec l'obtention d'un surnageant contenant une toxine fonctionnelle a poussé les expériences vers l'interaction directe entre les bactéries produisant des protéines RTX et les cellules cibles, puisque l'interaction directe permettrait l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes et la possibilité d'une interaction de la toxine suite à sa sécrétion dans le milieu de culture.

9.5.2.1 Fibroblastes aviaires

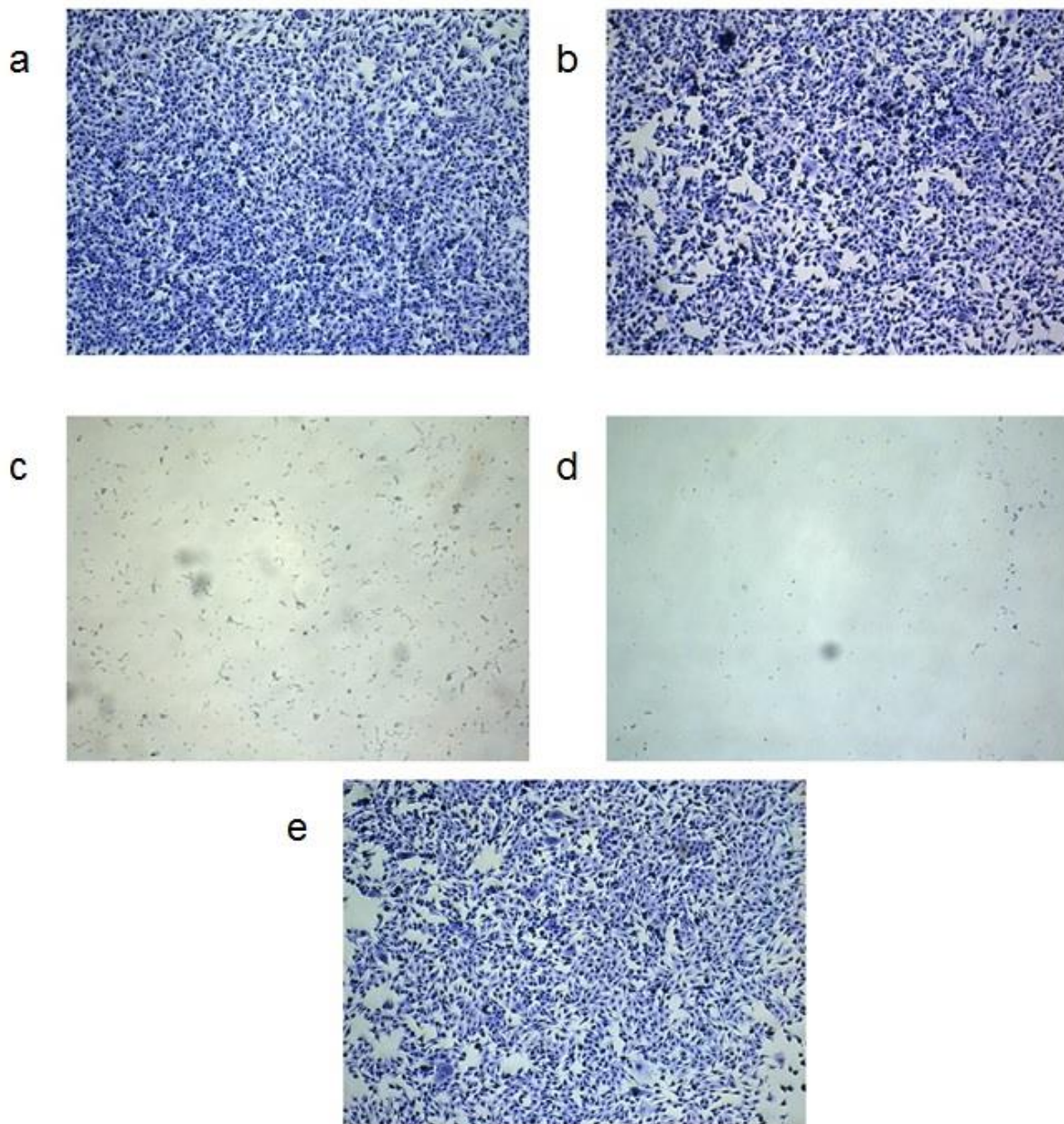


Figure 31 : Infections pendant 3 heures des fibroblastes aviaires en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1. a : cellules seules; b : plasmide vide; c : *prtCABD*; d : *hlyCABD*; e : Δ *prtC*

La [figure 31c](#) et la [figure 31d](#) montrent que les fibroblastes sont lysés suite à l'incubation de trois heures des cellules avec les souches d'*E. coli* codant la nouvelle toxine PrtA ou la toxine HlyA, respectivement. Les cellules incubées avec *E. coli* n'ayant

qu'un plasmide vide ne lysent aucunement et leur forme est identique à celle des cellules seules, tel que démontré à la [figure 31b](#) et à la [figure 31a](#). Une souche $\Delta prtC$ qui ne code pas pour l'acyltransférase est incapable de causer la lyse des fibroblastes, résultat démontré par l'abondance des cellules dans la [figure 31e](#).

La souche sauvage QT598 fut aussi testée afin de voir si la toxine sera produite et si celle-ci causera la lyse des fibroblastes. Aucune lyse n'est observable tant pour une MOI de 10 :1 qu'une MOI de 100 :1, soit 10 bactéries pour une cellule et 100 bactéries pour une cellule, respectivement. Les images de ce test sont présentées à la [figure 32](#).

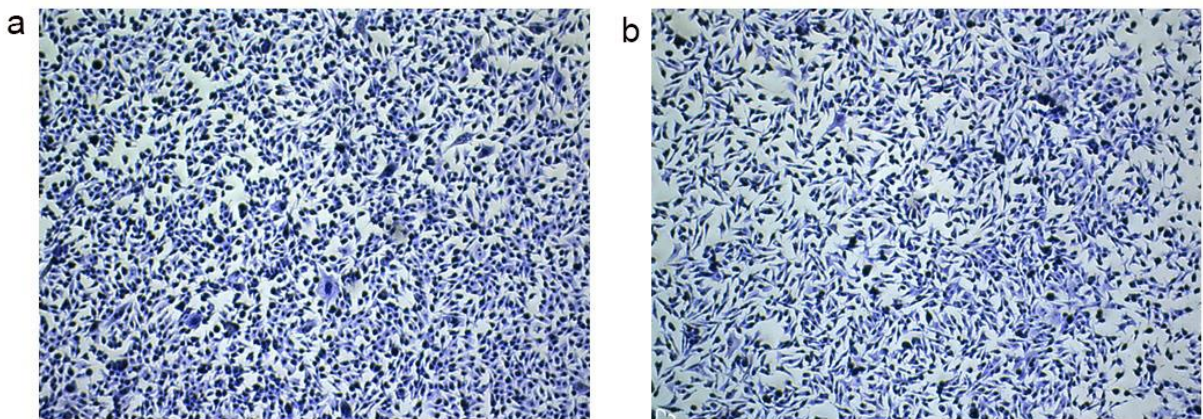


Figure 32 : Infections pendant 3 heures des fibroblastes aviaires avec la souche QT598 WT. a : MOI 10 :1; b : MOI 100 :1

9.5.2.2 Macrophages

Les toxines RTX sont avant tout des leucotoxines et les macrophages devraient être des cellules cibles de celles-ci, alors une étude de l'interaction bactérie-macrophage fut effectuée et PrtA est capable de lyser les macrophages humains THP1 en trois heures, tel que vu dans la [figure 33](#). Les macrophages ne sont pas lysés lorsqu'ils sont seuls, en présence d'une souche d'*E. coli* ayant seulement un plasmide vide ainsi qu'en présence de la souche mutante $\Delta prtC$ qui ne possède pas l'acyltransférase nécessaire à l'activation de la toxine. Ces trois résultats sont montrés dans les [figures 33a](#), [33b](#) et [33e](#) respectivement. Les [figures 33c](#) et [33d](#) montrent la

lyse des macrophages par la souche d'*E. coli* ayant le système *prtCABD* ou *hlyCABD*, respectivement.

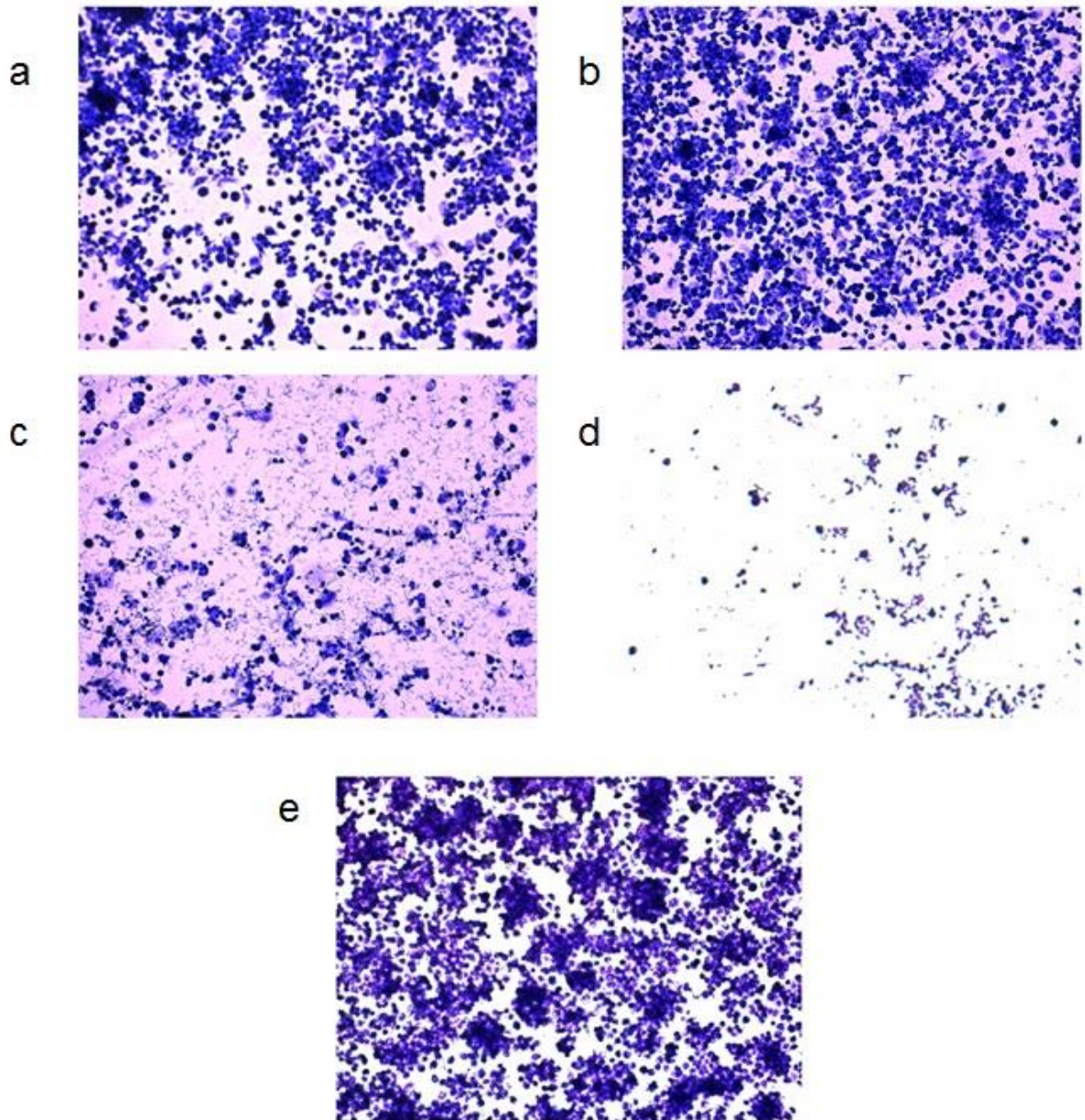


Figure 33 : Infections pendant 3 heures des macrophages humains THP1 en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1. a : cellules seules; b : plasmide vide; c : *prtCABD*; d : *hlyCABD*; e : Δ *prtC*

9.5.2.3 Cellules urothéliales

Des expériences effectuées par une collègue (Julie Buron, résultats non publiés) ont démontré la capacité de la souche sauvage de causer une infection du tractus urinaire dans notre modèle murin. Ceci nous poussa donc à tester l'effet de PrtA chez les cellules urothéliales humaines 5637, et PrtA démontre une activité lytique sur des cellules épithéliales de la vessie après une incubation de quatre heures. Ce résultat est observable à la [figure 34](#).

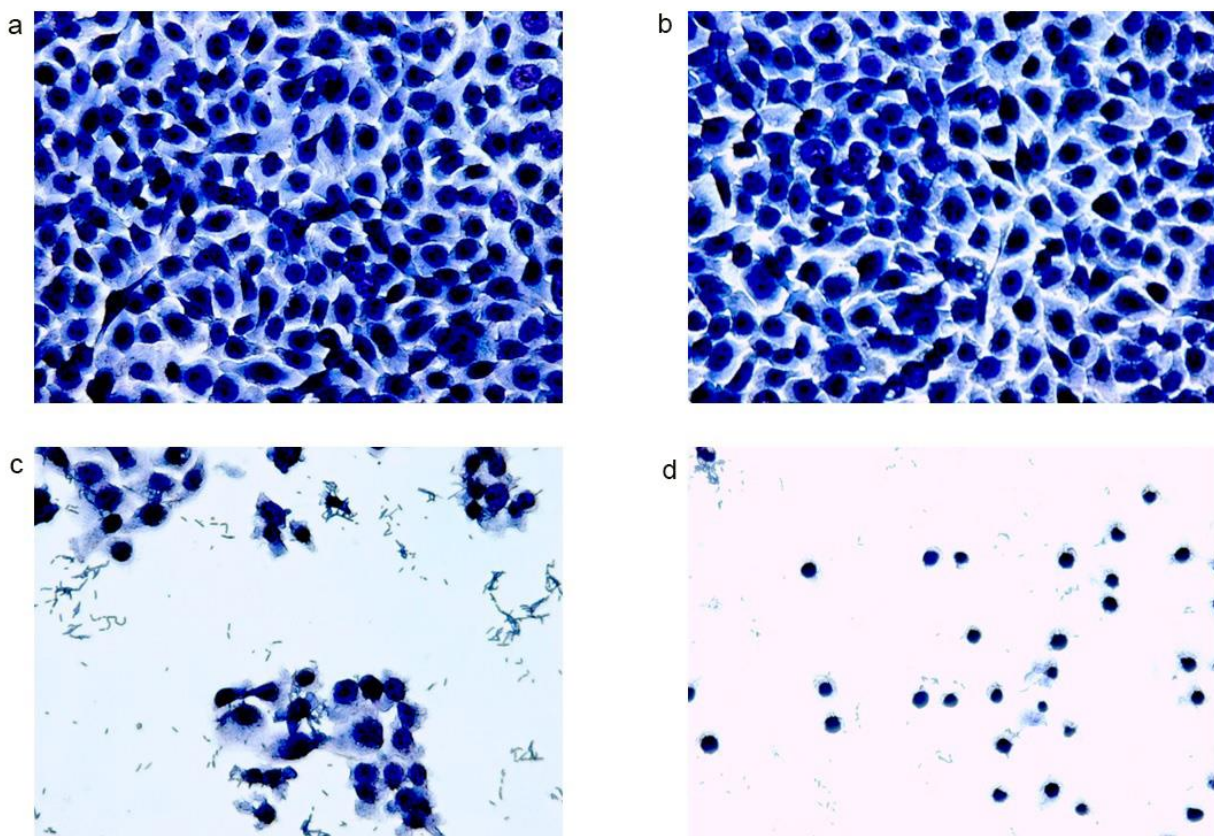


Figure 34 : Infections pendant 4 heures des cellules urothéliales en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1. a : cellules seules; b : plasmide vide; c : *prtCABD*; d : *hlyCABD*

9.5.2.4 Cellules rénales

Étant donné l'effet contre les cellules urothéliales, une infection des cellules rénales humaines HEK 293 fut effectuée, puisque l'infection du tractus urinaire commence par une infection de la vessie, mais peut se propager jusqu'aux reins. Une lyse des cellules rénales montrerait un rôle potentiel de la toxine PrtA dans la propagation de l'infection. Les résultats de cette infection sont présentés à la [figure 35](#). La [figure 35b](#) montre que les cellules rénales en présence de la souche d'*E. coli* K-12 avec le plasmide vide ne lysent pas et les cellules rénales sont semblables au contrôle négatif, soit les cellules seules, présenté à la [figure 35a](#). La [figure 35c](#) et la [figure 35d](#) montrent que la nouvelle toxine PrtA et la toxine HlyA causent la lyse des cellules rénales.

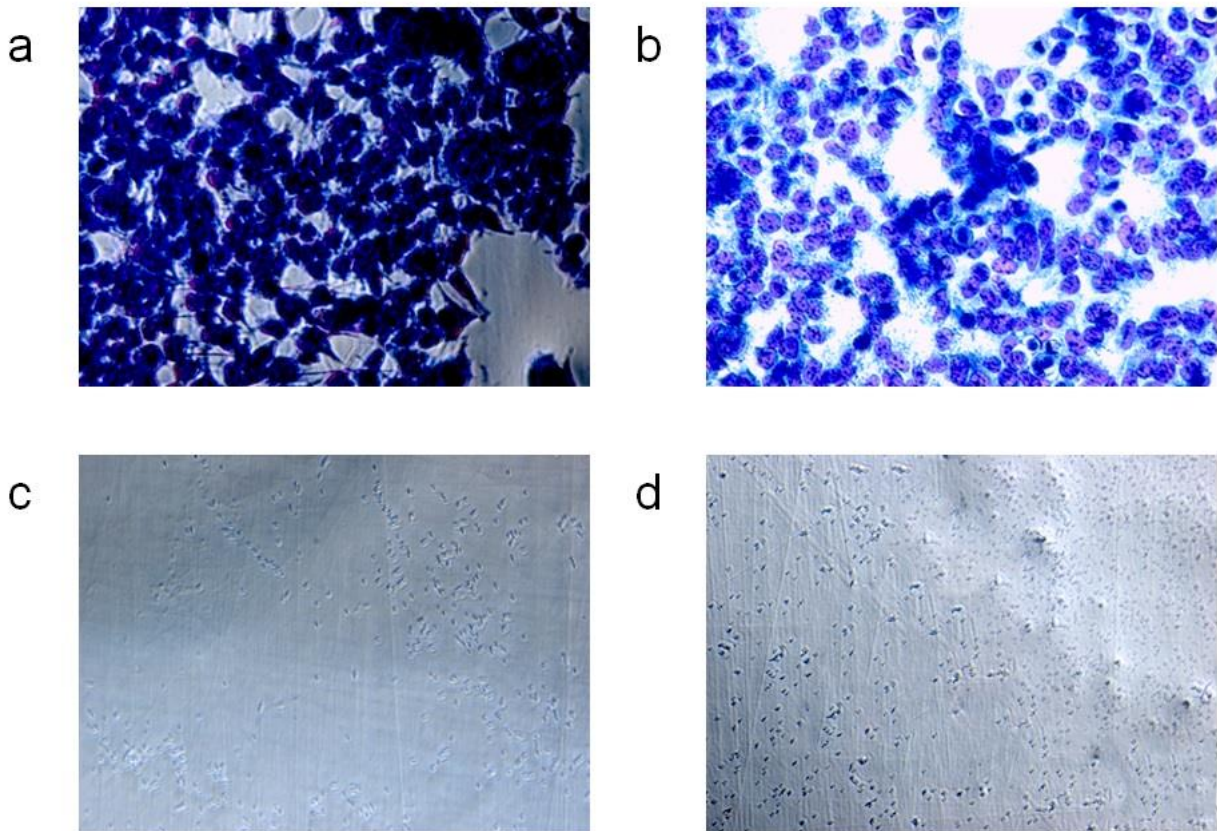


Figure 35 : Infection pendant 4h des cellules rénales humaines en plaque 96 puits avec une MOI de 10 :1. a : cellules seules; b : plasmide vide; c : *prtCABD*; d : *hlyCABD*

9.6 Infection du tractus urinaire chez la souris

9.6.1 Coinfection du tractus urinaire chez la souris entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$

Une coinfection du tractus urinaire murin fut effectuée afin d'identifier s'il y aurait un avantage de compétition pour la souche QT598 sauvage Δlac comparé à une souche mutante ne possédant pas le système *prtCABD*. La [figure 37](#) montre le résultat de l'infection, où la survie du mutant $\Delta prtCABD$ est significativement plus faible dans la vessie et les reins comparativement à la survie de la souche sauvage.

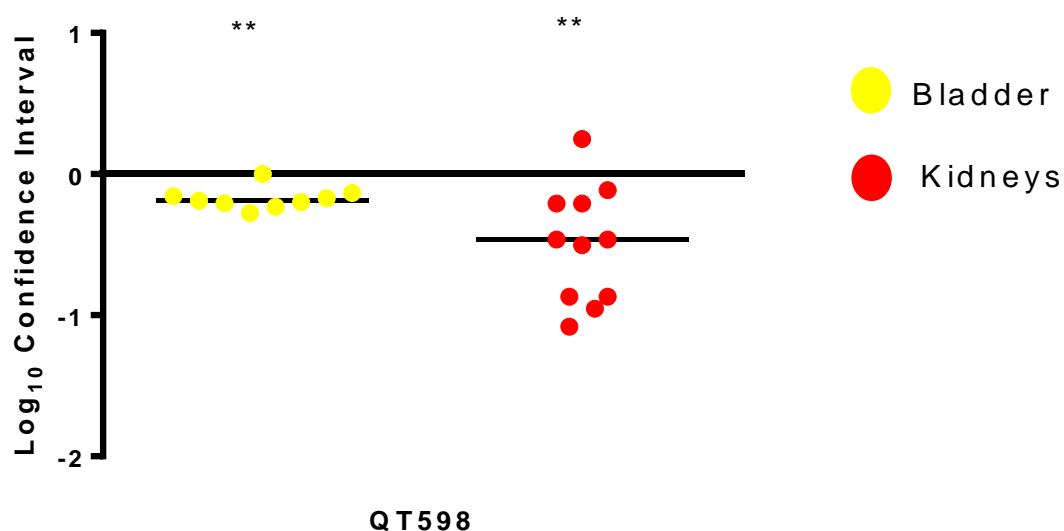


Figure 36 : Graphique des infections du modèle urinaire murin entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ où un décompte bactérien fut effectué dans la vessie et les deux reins.

9.6.2 Coinfection du tractus urinaire chez la souris entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complétementée avec le système $prtCABD$

Une coinfection du tractus urinaire murin fut effectuée entre la souche d'*E. coli* QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complétementée avec les quatre gènes $prtCABD$ au site attTn7 en simple copie. Afin de s'assurer que la survie plus faible de la souche QT598 $\Delta prtCABD$ lui manquant le système $prtCABD$ était dû à son absence, les quatre gènes furent réintroduits dans la souche à un endroit autre dans le génome sans affecter les autres gènes de la souche. L'introduction des gènes $prtCABD$ permet à la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complétementée de compétitionner au même niveau que la souche QT598 sauvage Δlac , démontré dans la [figure 37](#). Les différences dans les comptes observées ne sont pas significativement différentes tant dans la vessie que dans les reins.

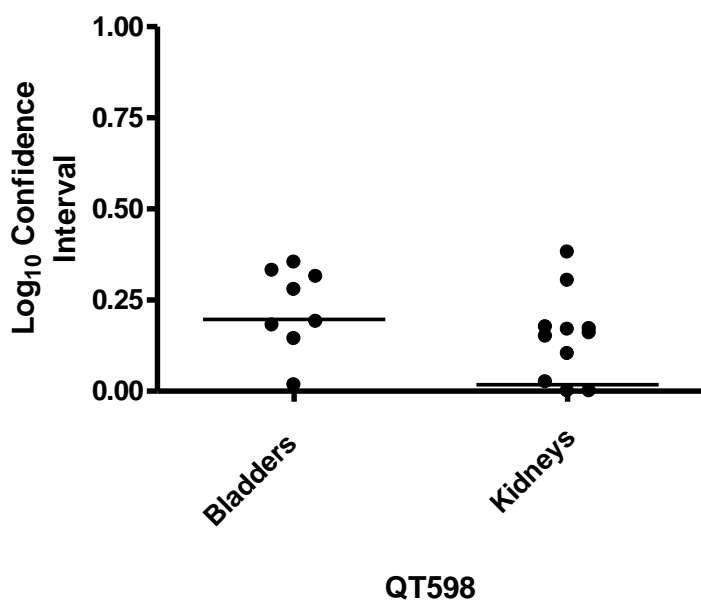


Figure 37 : Graphique des infections du modèle urinaire murin entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$ complétementée avec l'opéron $prtCABD$ au site attTn7 où un décompte bactérien fut effectué dans la vessie et les deux reins.

9.6.3 Monoinfection du tractus urinaire de la souris

Une monoinfection du tractus urinaire de la souris fut effectuée en infectant la moitié des souris avec la souche d'*E. coli* QT598 sauvage et l'autre moitié avec la souche QT598 $\Delta prtCABD$ lui manquant les quatre gènes *prtCABD*. La [figure 38](#) montre qu'au niveau de la vessie en monoinfection, le système *prtCABD* n'est pas important pour la colonisation de la vessie puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les comptes bactériens obtenus à la fin de l'expérience. Cependant, la différence est significative au niveau des reins, ce qui indique que le système *prtCABD* permet une meilleure survie de la souche à l'intérieur des reins.

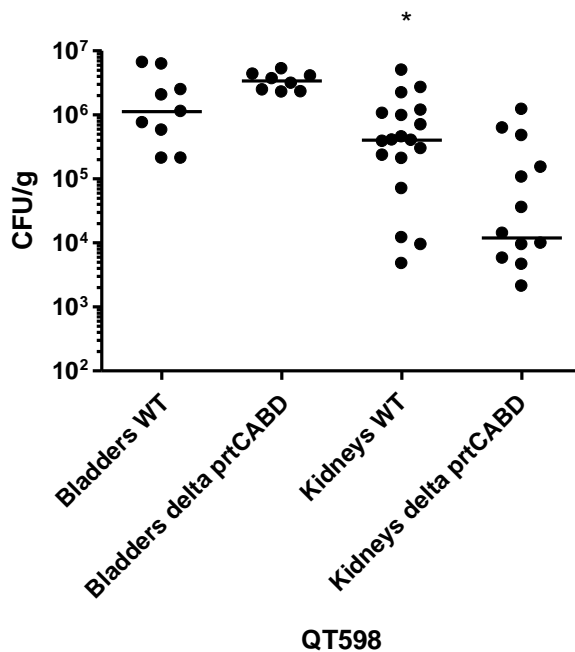


Figure 38 : Graphique de l'infection du tractus urinaire murin avec les souches d'*E. coli* QT598 sauvage et QT598 $\Delta prtCABD$ lui manquant les quatre gènes *prtCABD* où un décompte bactérien fut effectué dans la vessie et les deux reins.

9.7 Régulation

9.7.1 H-NS

La régulation de certaines toxines RTX, dont HlyA, est dépendante de la protéine H-NS, où en son absence l'expression de la toxine HlyA est augmentée ([Rimsky, 2004](#)). H-NS est nécessaire pour compacter l'ADN à l'intérieur de la cellule, mais il possède aussi un rôle de répresseur global des gènes, avec une affinité plus élevée lorsque la température de l'environnement est faible, soit autour de 25°C ([Tendeng et Bertin, 2003](#); [Rimsky, 2004](#)). À des faibles températures, H-NS lie l'ADN et empêche ainsi la transcription des gènes. Lorsque la température est supérieure à 30°C et surtout autour de 37°C, H-NS ne peut lier l'ADN, ce qui permet l'expression des gènes ([Tendeng et Bertin, 2003](#); [Rimsky, 2004](#)). La protéine H-NS est connue comme un répresseur des gènes de virulence bactériens puisque cette régulation permet à la bactérie de seulement exprimer ces gènes de virulence lorsqu'elle se retrouve à l'intérieur de l'hôte où la température est généralement plus élevée que l'environnement ([Rimsky, 2004](#)).

Les quatre gènes de l'opéron *prtCABD* furent introduits au site attTn7 en une seule copie dans la souche d'*E. coli* K-12 non pathogène BW25113 sauvage et la souche BW25113 Δhns lui manquant la protéine H-NS. Tel que démontré à la [figure 39](#), la souche BW25113 sauvage avec les quatre gènes de l'opéron *prtCABD* est incapable de causer une zone d'hémolyse sur gélose sang d'humain, tandis que la souche BW25113 Δhns est capable de causer une zone d'hémolyse sur la gélose sang. La souche BW25113 Δhns sans le système *prtCABD* fut aussi inoculée sur la gélose sang, et celle-ci n'est pas hémolytique. Ceci indique que la protéine H-NS a un rôle à jouer dans la répression de l'opéron *prtCABD*.



Figure 39 : Hémolyse sur gélose sang d'humains par la souche d'*E. coli* K-12 BW25113 sauvage et la souche BW25113 Δ H-NS lui manquant la protéine H-NS. La gélose sang est supplémentée avec 10mM de calcium.

9.7.2 Fusion du promoteur *prt* avec les gènes *luxCDABE*

La [figure 40](#) montre la luminescence captée pendant une période d'incubation de 24 heures de la souche d'*E. coli* QT598 sauvage avec le promoteur *prt* fusionné avec les gènes *luxCDABE* à 30°C, 37°C et 42°C. L'expression est plus élevée à 30°C, où la luminescence captée est 2 fois plus élevée que lorsque les bactéries sont incubées à 37°C et 32 fois plus élevée que lorsque les bactéries sont incubées à 42°C. De plus, l'expression est plus élevée en présence de fer, puisqu'il y a expression dans le milieu riche LB et le milieu LB supplémenté en fer et il n'y a pas d'expression lorsque le fer est chélaté du milieu.

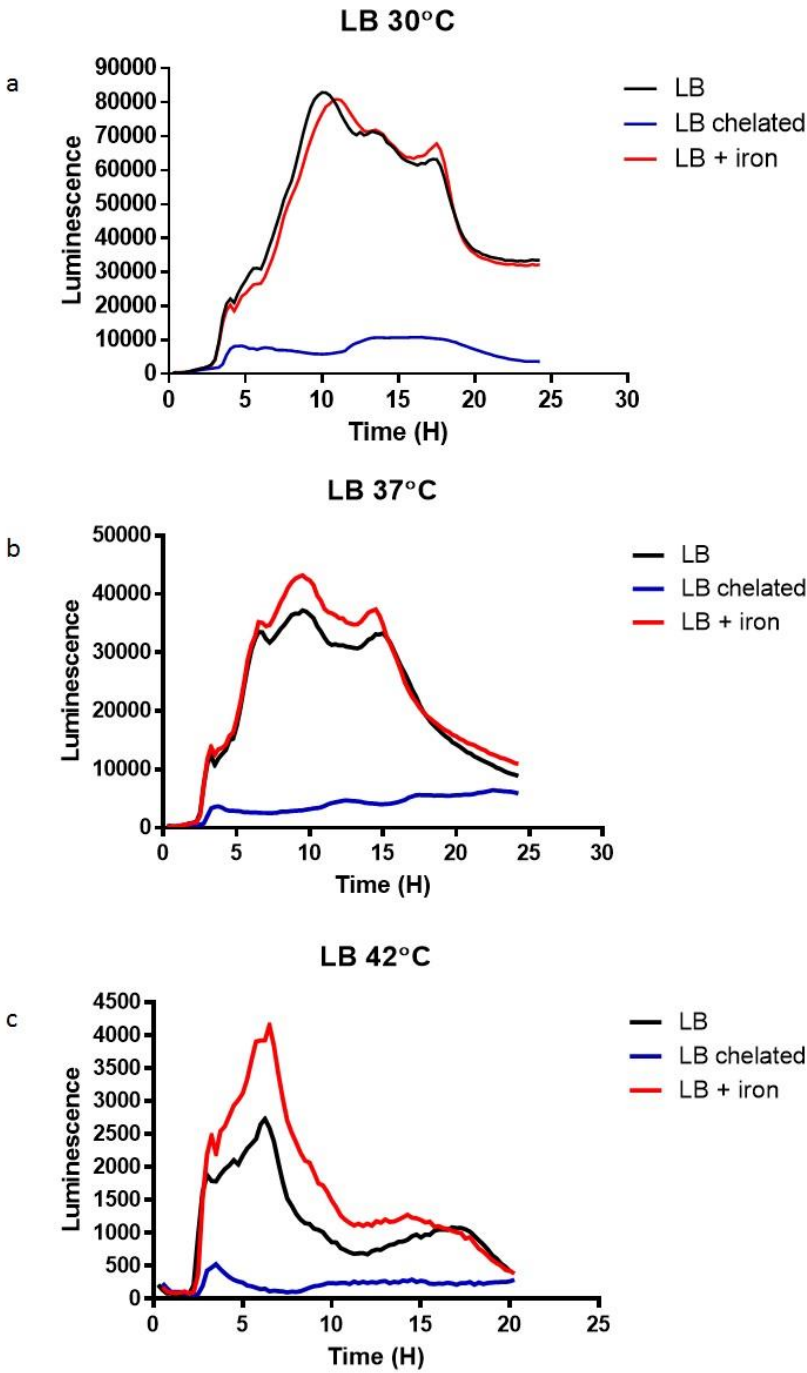


Figure 40 : Luminescence captée pendant 24 heures à 30°C, 37°C et 42 °C lors de l'incubation de la souche QT598 sauvage ayant le promoteur *prt* fusionné avec les gènes *luxCDABE* dans du milieu LB, LB avec fer et LB avec un chélateur de fer.

DISCUSSION

10.1 Comparaisons phylogénétiques des protéines RTX

Tel que vu dans les tableaux [5](#), [6](#) et [7](#), les produits des gènes *prtCAB* sont aussi retrouvés chez trois souches UPEC, soit UMEA 3489-1, UMEA 3585-1 et UMEA 3703-1, et ils sont très semblables aux gènes présents chez la souche QT598. Le produit du gène *prtD* est une exception, où ce gène est conservé seulement chez la souche UMEA 3703-1 et il est très différent chez UMEA 3489-1. Les produits des gènes *prtCA* sont différents des produits des gènes *hlyCA* et *ehxCA* provenant des souches UPEC CFT073 et EHEC O157 :H7, respectivement. HlyBD et EhxBD, cependant, démontrent une identité plus élevée avec PrtBD et les protéines de transport semblent être plus conservées parmi ces trois systèmes RTX identifiés chez des souches d'*E. coli* pathogènes, soit HlyA, EhxA et PrtA. Les quatre produits des gènes de système RTX identifiés chez *Cronobacter malonaticus* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* sont également très semblables à ceux du système Prt.

La présence des toxines RTX chez *Escherichia coli* est habituellement associée avec un transfert génétique des espèces de la famille Pasteurellaceae et ce ne serait point surprenant que cette nouvelle toxine RTX ne soit pas une exception. La présence des protéines PrtC, PrtA et PrtB de QT598 chez les trois souches UMEA, et ce, avec une très forte homologie, suggère un transfert de ce système entre ces souches, mais avec aucune autre souche d'*E. coli*. La protéine RtxC peut provenir d'*A. actinomycetemcomitans* ou de *C. malonaticus*, mais la forte homologie avec RtxA de cette dernière espèce suggèrerait une provenance des gènes *prtCA* de *C. malonaticus*, puisque le gène *prtA* ne semble pas être similaire à *A. actinomycetemcomitans*. De plus, la similarité entre les deux gènes de transport *prtBD* avec *C. malonaticus* renforce cette suggestion, quoi que *A. actinomycetemcomitans* suit très proche derrière pour ces deux gènes. Ceci n'est pas trop surprenant puisque les protéines de transport sont composées de domaines très conservés puisque ces parties ne sont pas exposées au système immunitaire et ne sont donc point sous une pression sélective. La portion qui doit changer est la partie de PrtB et PrtD reconnaissant le substrat, et ceci explique les

quelques différences retrouvées dans les séquences des protéines PrtB et PrtD, en particulier lorsqu'on regarde les souches CFT073 et O157 :H7 d'*E. coli*, dont leurs toxines et acyletransférases ne sont pas très proches phylogénétiquement. Étant donné que les gènes de transport sont généralement conservés, il est très surprenant de remarquer que le gène *rtxD* d'UMEA 3585-1 contient plusieurs différences, et encore plus celui d'UMEA 3489-1, qui est loin d'être similaire à celui de QT598. Des mutations dans le gène *rtxD* d'UMEA 3585-1 pourraient expliquer les différences, tandis que la provenance du gène *rtxD* d'UMEA 3489-1 d'une autre espèce, soit lors de l'acquisition du système *rtxCABD* ou suite à une recombinaison avec un autre gène codant une protéine transmembranaire, est l'hypothèse prédominante pour expliquer cette différence majeure. L'homologie avec le système *apxIII* d'*A. pleuropneumoniae*, laisse penser que PrtA de QT598 pouvait aussi provenir d'*A. pleuropneumoniae*, puisque chacun des gènes de l'opéron semble être rapproché de notre toxine. Malgré la forte homologie des gènes de transport avec ceux de *C. malonaticus* et *A. pleuropneumoniae*, il est toujours possible que ce système soit acquis par blocs, les gènes *rtxCA* provenant de *C. malonaticus* ou *A. pleuropneumoniae* et *prtBD* des souches *E. coli* O157 :H7 ou CFT073.

Finalement, le contenu en G+C, soit la quantité de guanine et cytosine dans l'ADN, est spécifique à chaque espèce, pouvant aller de 13% à 75%, et varie à l'intérieur d'un même génome à cause de transfert de gènes ([Lassalle et al., 2015](#)). Des variations de la concentration de G+C dans un gène suggèrent souvent que ce système fut acquis par transfert horizontal avec une autre espèce ([Hildebrand et al., 2010](#); [Lassalle et al., 2015](#)). Le contenu en G+C d'*Escherichia coli* est généralement de 50%, avec une moyenne de 52.5% ([Muto et Osawa, 1987](#)). L'opéron *PrtCABD* a un faible contenu en G+C, soit de 45% pour l'opéron au complet et 47% pour le gène *prtA*, et il est considéré A-T riche. Le contenu en G+C du génome de *Cronobacter* se tient autour de 57-58%, ce qui diminue la probabilité de transfert de l'opéron de *Cronobacter* à *E. coli* ([Joseph et al., 2012](#); [Yan et al., 2013](#)). Toutefois, le contenu en G+C de la famille Pasteurellaceae se retrouve dans la plage de 37 à 45% ([Kuhnert et Christensen, 2008](#)). Plus spécifiquement, celui d'*A. pleuropneumoniae* et *M. haemolytica* est de 41%, tandis que le contenu G+C d'*A. actinomycetemcomitans* se tient à 44% ([Foote et al., 2008](#);

[Kuhnert et Christensen, 2008](#)). En tenant en compte le contenu en G+C, il semblerait plutôt que l'opéron provient d'un membre de la famille Pasteurellaceae, probablement du système *apxIII* d'*A. pleuropneumoniae* ou *ltx* d'*A. actinomycesetemcomitans*, puisque les gènes de l'opéron des toxines RTX de ces espèces sont les plus rapprochés de notre toxine. Les gènes *cbd* d'*A. actinomycesetemcomitans* sont plus proches que ceux d'*A. pleuropneumoniae*, mais le gène A de ce dernier est plus similaire.

En tenant en compte de chacun des éléments mentionnés, le système *prtCABD* proviendrait originellement d'un membre de la famille Pasteurellaceae, soit *A. pleuropneumoniae* ou *A. actinomycesetemcomitans*. Il fut ensuite transféré à *C. malonaticus* et ce dernier le transféra à *E. coli*. Le plasmide pEC598 contient le système codant le sidérophore aérobactine, mais l'aérobactine n'est pas fonctionnelle à cause de la présence d'un codon d'arrêt qui empêche la production d'une molécule d'aérobactine complète. Le plasmide chez les trois souches UMEA (3703-1, 3585-1 et 3489-1) ne contient pas le système d'aérobactine. L'hypothèse est donc que la souche d'*E. coli* QT598 fut la première à acquérir le plasmide pEC598, et que ce dernier se transféra plus tard aux trois souches UMEA. Puisque le système codant l'aérobactine ne résulte pas en une protéine fonctionnelle, celui-ci subit une délétion du plasmide au fil du temps.

10.2 Visualisation sur gel et séquençage protéique

Le clonage du système *prtCABD* chez *E. coli* K-12 fut vérifié par PCR en criblant pour la présence du gène *prtA* ainsi qu'en observant un phénomène d'hémolyse sur gélose sang de mouton. La littérature suggère que la toxine devrait être sécrétée dans le surnageant, et ceci est confirmé par la précipitation des protéines du surnageant d'une culture O/N et la migration sur gel SDS-PAGE. La masse moléculaire théorique de la toxine est de 91.73 kDa, et cette bande devrait donc se trouver entre les bandes de 85 kDa et 100 kDa de l'échelle moléculaire, et ceci est ce qu'on observe à la [figure 22](#). Cette taille théorique ne tient cependant pas en compte le poids supplémentaire des lysines acylées, et ceci est la raison pour laquelle la bande de la toxine semble être plus élevée. Le même phénomène est observable tant pour HlyA que pour EhxA, où

l'acylation augmente la taille de la protéine d'environ une dizaine de Da ([Bauer et Welch, 1996b](#); [Fiser et Konopasek, 2009](#)).

Toutefois, afin de s'assurer de partir du bon pied et d'avoir en possession la bonne toxine, le séquençage de la bande fut effectué. La comparaison des peptides obtenus par digestion protéique avec une banque de données qui inclue la nouvelle toxine RTX démontre que c'est bien la nouvelle toxine RTX qu'on avait visualisée sur gel de polyacrylamide. Les peptides en rouges de la [figure 23](#) représentent les peptides ayant 100% de similarité avec notre toxine et, malgré le fait que les peptides en noirs ne font pas partie de notre toxine, la similarité avec PrtA était très élevée, et des différences peuvent être dues à une erreur de séquençage. C'est donc bien la protéine PrtA.

10.3 Hémolyse sur gélose sang et effets des mutants

L'absence de l'acylateur PrtC ne devrait aucunement empêcher la sortie de la toxine, quoique celle-ci ne devrait pas être active. La [figure 24](#) montre que la toxine est sécrétée dans le surnageant et les [figures 25](#), [26](#), [28](#), [31](#) et [33](#) démontrent le manque d'activité cytotoxique de la protoxine chez le mutant $\Delta prtC$. La toxine est absente du surnageant du mutant $\Delta prtA$ et celui-ci ne cause aucune lyse des globules rouges sur gélose sang de mouton et sang humain, tel que vue dans la [figure 25](#) et dans la [figure 26](#), ce qui n'est pas surprenant étant donné que la toxine est absente de l'opéron. Quant aux trois gènes d'exports, soit *prtB*, *prtD* et *tolC*, une mutation d'un de ceux-là empêche la sortie de la toxine et celle-ci se trouve seulement dans le culot des souches, et aucun de ces mutants n'est hémolytique sur gélose sang ([figure 25](#) et [figure 26](#)). La présence d'une zone hémolytique sur gélose sang avec le clone *prtCABD* et *hlyCABD*, aux figures [25](#) et [26](#), montrent bien que les érythrocytes de moutons et d'humains des géloses sont sensibles à la lyse et que celle-ci est visible lorsqu'elle a lieu. Le rôle de chacun des gènes concorde avec les toxines RTX déjà caractérisées.

Il est intéressant à noter que la nouvelle toxine RTX semble être beaucoup plus dépendante du calcium que HlyA, voire même plus fragile. En absence de calcium sur la gélose sang, la zone d'hémolyse causée par HlyA est plus grande que celle causée

par PrtA (résultat non montré). La zone d'hémolyse de PrtA augmente de taille et devient plus évidente à observer lorsque la gélose sang est supplémentée avec une concentration de 10 mM de calcium.

10.4 Hémolyse en liquide

La [figure 27](#) montre l'absence de lyse des érythrocytes humains par PrtA et la [figure 29](#) montre l'absence de lyse des érythrocytes aviaires par PrtA. Tout d'abord, la présence de lyse des érythrocytes humains et aviaires par le contrôle positif HlyA montre que la méthode utilisée est bien fonctionnelle, et l'absence de lyse par la nouvelle toxine RTX, dont la densité optique du surnageant est égale à celle des contrôles négatifs, est évidemment due à un manque de reconnaissance des globules rouges provenant des espèces choisies. L'absence de lyse des érythrocytes aviaires reste toutefois intrigante, puisque la toxine provient d'une souche aviaire et la lyse des érythrocytes aviaires permettraient l'acquisition du fer de l'hème. La souche QT598 fut quand même isolée d'une dinde, et du sang de cet animal mènerait peut-être à un résultat positif pour le test d'hémolyse. La présence de lyse sur gélose sang de mouton, mais l'absence de lyse des globules rouges humains et aviaires en milieu liquide pourrait être due à un effet de concentration. En effet, l'incubation sur gélose sang de mouton se fait sur toute la nuit, tandis que le test en milieu liquide se fait sur une heure. Il est donc possible que la toxine ne soit pas spécifique pour les érythrocytes de moutons, mais la concentration élevée de toxines relâchées sur une longue période finit par causer la lyse des érythrocytes ovins. Cette pensée nous a menés à tester la lyse des érythrocytes humains en gélose, tel que présenté à la [figure 28](#), afin de voir s'il y aurait une lyse sur une période de 24 heures, et la réponse était positive. Ce résultat nous a donc incités à tester la lyse des érythrocytes humains liquides sur une plus longue période de temps, et une période de 4 heures fut choisie. Tel que présenté à la [figure 28](#), une période de 4 heures était suffisante pour permettre à la toxine RTX de causer la lyse des érythrocytes humains. Cette longue période d'incubation n'est pas la cause de la lyse puisque les globules rouges incubés avec des bactéries ne produisant pas de toxines ou incubés avec de la saline présentèrent un très faible niveau de lyse.

Nous n'avions pas réussi à acquérir du sang de poulet pour tester la lyse en milieu liquide des érythrocytes aviaires sur une période plus longue, mais ce test serait important à faire afin de déterminer si les érythrocytes aviaires sont une cible de la toxine. La nécessité d'une plus longue période de temps n'est pas très surprenante, puisque même EhxA de la souche d'*E. coli* O157 :H7 nécessite une longue incubation sur gélose sang de mouton avant d'observer une zone d'hémolyse, soit 16 heures au lieu de 4 heures, temps nécessité par HlyA de la souche d'*E. coli* CFT073 ([Bielaszewska et al., 2014](#)). Ceci est dû à une faible affinité par EhxA d'*E. coli* O157 :H7 envers les érythrocytes ([Bielaszewska et al., 2014](#)).

10.5 Infections *in vitro*

Les fibroblastes aviaires, les macrophages humains, les cellules urothéliales humaines et les cellules rénales humaines sont lysés plus rapidement par le contrôle positif HlyA, mais PrtA lyse très bien ces cellules malgré le fait qu'elle semble agir d'une façon plus lente. L'absence de lyse avec les surnageants des souches, même pour HlyA, nous força à utiliser une interaction bactérie-cellule, et, comme vue par le contrôle négatif DH5- α plasmide vide, les cellules ne lysent pas par la simple présence des bactéries ni par la présence de LPS comme peut le confirmer la [figure 32](#) où la présence de la souche sauvage exprimant le LPS ne tue aucunement les cellules même à une MOI de 100 :1.

L'absence de lyse par la souche sauvage peut être due à une répression du système dans les conditions utilisées. Certaines études ont démontré que l'expression de la toxine HlyA est augmentée dans un milieu faible en fer, tandis que le milieu utilisé dans ces expériences est un milieu riche en nutriment ([Wiles et Mulvey, 2013](#)). De plus, en utilisant des cultures O/N, on ne donne peut-être pas assez de temps à la souche sauvage de produire la toxine, puisque les toxines RTX ont tendance à être produite en milieu de la phase exponentielle et arrête en phase stationnaire. Les clones utilisés dans ces expériences possèdent le promoteur natif, mais manquent plusieurs régulateurs que seules les souches sauvages cliniques possèdent, faisant en sorte que l'opéron est exprimé de façon constitutive. De plus, il est possible que la toxine PrtA soit

exprimée par la souche sauvage seulement *in vivo* et jamais *in vitro*, tout comme la toxine ApxIV ([Gimenez-Lirola et al., 2014](#)). Une analyse de l'expression de la toxine pourrait donner les informations manquantes pour ajuster le protocole. La toxine PrtA, tout comme HlyA, semble avoir un spectre étroit au niveau de ces cellules cibles.

10.6 Infection *in vivo*

En regardant les résultats de la coinfection entre la souche QT598 sauvage Δlac et la souche QT598 $\Delta prtCABD$, la toxine semble être importante pour l'étape primaire et secondaire de l'infection, soit l'infection de la vessie et l'infection des reins respectivement, car en son absence le mutant survit avec plus de difficulté que la souche sauvage dans les deux organes. Une analyse de l'ARN récolté des vessies et reins permettrait de savoir le niveau d'expression des gènes de l'opéron *prtCABD* et si la toxine semble être plus importante lors de l'infection d'un des deux organes. Cependant, en monoinfection, la différence observée dans la survie de la souche QT598 $\Delta prtCABD$ n'est pas significativement différente de la survie de la souche QT598 sauvage, ce qui peut indiquer que lorsque la bactérie n'est pas en compétition, la toxine est moins importante pour établir l'infection de la vessie. La différence dans la survie de la souche QT598 $\Delta prtCABD$ dans les reins est significativement différente comparée à la survie de la souche QT598 sauvage, ce qui indique que sans compétition, la toxine est importante pour l'infection des reins.

La complémentation de la souche QT598 $\Delta prtCABD$ avec les gènes *prtCABD* intégrés dans le site att Tn7 permet de rétablir le phénotype de la souche QT598 sauvage, indiquant que la différence observée dans la survie de la souche QT598 $\Delta prtCABD$ était bien due à l'absence de la toxine.

10.7 Régulation

La souche d'*E. coli* K-12 BW25113 sauvage avec les gènes *prtCABD* n'est pas hémolytique sur gélose sang, mais la souche BW25113 Δhns avec le système *prtCABD* est hémolytique. H-NS (« Histone-like nucleoid structuring protein ») est une petite protéine retrouvée chez plusieurs bactéries Gram négatif capables de lier l'ADN de façon séquence indépendant, avec une grande affinité pour l'ADN courbé, et joue deux rôles ([Rimsky, 2004](#)). Premièrement, il permet de compacter l'ADN et deuxièmement, il est un régulateur global de la transcription de plus de 200 gènes ([Tendeng et Bertin, 2003](#)). Il est déjà connu que la régulation de la toxine HlyA d'*E. coli* est affectée par la protéine H-NS, où l'élévation de la température diminue la courbature de l'ADN et donc l'affinité de H-NS pour l'ADN, ce qui résulte en une augmentation de l'expression de la toxine puisque H-NS ne lie plus l'ADN ([Rimsky, 2004](#)). Une souche qui ne possède pas H-NS est plus hémolytique sur gélose sang, ce qui concorde avec nos observations. Il est à noter qu'en absence de la protéine H-NS, l'expression des gènes *hlyC* et *hlyBD* est augmentée, mais celle du gène *hlyA* n'est pas affectée. Cette hausse dans l'activité hémolytique résulte d'une sécrétion de plus de toxines et/ou d'une augmentation de la quantité de toxines acylées, et donc actives, par la présence d'une plus grande quantité de HlyC ([Muller et al., 2006](#)). Il est donc possible que la zone d'hémolyse causée par PrtA observée chez le clone Δhns soit due à l'augmentation de l'expression des gènes *prtC* et/ou *prtBD*, et non pas de celui de *prtA*. Une analyse de l'ARN permettrait de mieux comprendre l'effet de H-NS dans la régulation du système *prtCABD*.

La répression de la production de toxine dans un milieu faible en fer est similaire à ce que certaines études ont démontré avec la toxine HlyA, même si c'est contre-intuitif puisqu'une toxine capable de lyser des érythrocytes pourrait aider à la capture du fer ([Robertson et al., 2006](#)). Ceci est cependant en désaccord avec les études ayant montré une augmentation de la production de la toxine HlyA lorsque la concentration de fer dans le milieu est faible, tel que mentionné plus haut. Une collègue du laboratoire (Gaëlle Porcheron, résultat non publié) a montré que l'expression de la toxine HlyA est réprimée chez une souche Δfur et la souche n'est pas hémolytique sur gélose sang. Dans un milieu riche en fer, les protéines nécessaires pour capter le fer, des cibles de

Fur, sont réprimées. Une fois que la concentration de fer est faible, Fur n'est plus actif et ces protéines peuvent être exprimées. Une souche Δfur ne possède pas ce régulateur et l'expression génétique mimique un milieu faible en fer. L'absence d'hémolyse chez une souche qui ne possède pas Fur indique que la toxine HlyA n'est pas exprimée dans un milieu faible en fer, et ceci correspond avec les résultats obtenus avec la fusion du promoteur *prt* avec les gènes *luxCDABE*.

Il est connu que l'affinité de la protéine H-NS pour l'ADN est plus élevée à 25°C qu'à 30°C et 37°C, donc il n'est pas surprenant de remarquer que l'expression est élevée à 30°C ([Rimsky, 2004](#)). Il est néanmoins surprenant que le niveau d'expression diminue lorsque la température d'incubation augmente à 37°C et que l'expression diminue encore plus à une température de 42°C. Généralement, l'augmentation de la température diminue la courbature de l'ADN, ce qui a pour effet de diminuer l'affinité entre H-NS et l'ADN et le résultat attendu serait une augmentation de l'expression des gènes réprimés par H-NS. La présence d'un autre régulateur température-dépendant qui n'a pas encore été identifié pourrait être responsable de la diminution de l'expression avec l'augmentation de la température. Des cibles potentielles à regarder seraient Hha, RfaH et des régulateurs de quorum sensing tel que des systèmes à deux composantes ([Thomas et al., 2014](#)).

L'expression de la toxine PrtA de la souche APEC QT598 est très faible à une température de 42°C, soit la température corporelle normale du poulet ([Stathopoulos et al., 1999](#)). Cet effet peut signifier que la toxine n'est pas importante pour établir une infection chez le poulet et c'est pour cela que l'expression est réduite. D'un autre point de vue, l'expression est réduite à une température de 42°C pour éviter une surproduction de la toxine et une exfoliation accrue des cellules du poulet, ce qui pourrait finir par expulser les bactéries et réduire la virulence de la souche, tel qu'observé avec une surexpression de la toxine HlyA ([Nagamatsu et al., 2015](#)).

La production de la toxine augmente avec le temps et elle est plus élevée au milieu et vers la fin de la phase exponentielle, et diminue lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire, ce qui est en lien avec ce qui fut observé chez la toxine HlyA ([Thomas et al., 2014](#)).

CONCLUSION

Le séquençage de la souche APEC O1 QT598 par notre laboratoire révéla la présence d'une région unique sur le plasmide de virulence ColV pEC598 codant pour plusieurs facteurs de virulence, soit un fimbriae, autotransporteur et toxine RTX, et cette dernière fût nommée « *plasmid-encoded RTX toxin* » (prt). L'opéron de la toxine RTX est composé de quatre gènes, *prtCABD*, où la toxine, codée par le gène *prtA*, nécessite l'acylateur PrtC afin d'adopter sa conformation active. Toutefois, tout comme pour les autres toxines RTX, l'absence de l'acylateur n'empêche point la sortie de la toxine et celle-ci se retrouve dans le surnageant. Les gènes *prtBD* ainsi que *tolC*, codant pour une protéine de la membrane externe nécessaire pour la sécrétion de divers composés, sont nécessaires pour la sécrétion de la toxine. En l'absence d'un de ces gènes, la toxine reste dans le cytoplasme et aucune lyse n'est observée sur gélose sang.

La toxine est capable de lyser les érythrocytes de moutons et d'humains sur milieu solide suite à une incubation de 18 heures. En sang liquide cependant, une seule heure n'est pas suffisante pour lyser les globules rouges humains et aviaires, mais les érythrocytes humains lysent lorsque le temps d'incubation est augmenté à 4 heures. Malheureusement, il ne restait plus de sang aviaire liquide et nous n'avions pas réussi à obtenir plus de sang aviaire afin d'effectuer le test sur une plus longue période d'incubation et ainsi déterminer s'il y aura une lyse sur une longue période. Il serait aussi important d'effectuer le test de lyse des érythrocytes aviaires sur gélose. Il serait aussi important de tester du sang de mouton liquide, et même du sang de divers animaux, afin de déterminer les érythrocytes cibles de la toxine PrtA. Le sang d'un des animaux à tester serait la dinde puisque cette souche fut isolée à partir d'une dinde.

Les macrophages humains, les fibroblastes aviaires, les cellules urothéliales et les cellules rénales sont lysés par la toxine lors des interactions bactéries-cellules. La lyse des cellules urothéliales et rénales indique l'importance potentielle de ce facteur de virulence lors de l'infection du tractus urinaire.

Dans le modèle urinaire murin, la toxine PrtA est nécessaire pour permettre la compétition par la souche QT598 dans la vessie et dans les reins, mais la toxine semble être importante dans l'établissement de l'infection au niveau des reins, mais n'affecte pas l'infection de la vessie lorsque la bactérie n'est pas en compétition avec d'autres bactéries.

L'intégration du système *prtCABD* dans une souche d'*E. coli* K-12 Δhns montre que le système est sous la régulation de HN-S ou est régulé par une molécule qui est dépendante de HN-S. Une mutation de HN-S dans la souche QT598 sauvage permettrait peut-être d'observer une zone d'hémolyse sur gélose sang.

La fusion du promoteur *prt* avec les gènes *luxCDABE* permet de déterminer que la toxine est exprimée seulement lorsque le milieu contient du fer et l'expression est 2 fois plus élevée à 30°C que 37°C et 32 fois plus élevée à 30°C qu'à 42°C. Il faudrait tester une température d'incubation de 25°C puisque l'affinité de la protéine H-NS est plus élevée à 25°C, ce qui causerait une répression du système *prtCABD*. Il serait important de regarder le rôle des régulateurs qui sont connus d'être exprimé ou réprimé selon la température. Des études préliminaires effectuées lors de cette maîtrise ont déjà montré que l'expression de la toxine est très faible dans le milieu minimal M9 faible en fer et que l'expression augmente lorsque le milieu M9 est supplémenté avec 10 μ M de fer (résultats non montrés). L'expérience reste à être répétée afin de valider les résultats obtenus avec le milieu M9. De plus, tester le niveau d'expression suite à l'intégration de la fusion du promoteur *prt* avec les gènes *luxCDABE* dans les mutants *fur*, *ryhB* et doubles mutants *fur/ryhB* de la souche QT598 permettraient de voir un effet des systèmes de régulation du fer sur l'expression de la toxine. L'intégration de cette fusion chez un mutant *hns* de la souche QT598 permettrait aussi de voir les changements d'expression lorsque le régulateur global H-NS n'est pas présent. Une PCR quantitative serait intéressante à effectuer afin de déterminer si la régulation affecte seulement la transcription des gènes *prtC*, *prtB* et *prtD*, ou si la transcription du gène *prtA* est aussi affectée.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrudan, M. I., S. Brown and D. E. Rozen (2012). "Killing as means of promoting biodiversity." Biochem Soc Trans **40**(6): 1512-1516.
- Ahn, J. H., J. G. Pan and J. S. Rhee (1999). "Identification of the *tliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1." J Bacteriol **181**(6): 1847-1852.
- Aldick, T., M. Bielaszewska, B. E. Uhlin, H. U. Humpf, S. N. Wai and H. Karch (2009). "Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin." Mol Microbiol **71**(6): 1496-1508.
- Aldick, T., M. Bielaszewska, W. Zhang, J. Brockmeyer, H. Schmidt, A. W. Friedrich, K. S. Kim, M. A. Schmidt and H. Karch (2007). "Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium." Microbes Infect **9**(3): 282-290.
- Alteri, C. J. and H. L. Mobley (2012). "*Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments." Curr Opin Microbiol **15**(1): 3-9.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Andersen, C., C. Hughes and V. Koronakis (2001). "Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 412-416.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-237.
- Atapattu, D. N. and C. J. Czuprynski (2005). "*Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells (BL-3) via a caspase-9-dependent mitochondrial pathway." Infect Immun **73**(9): 5504-5513.
- Bakas, L., H. Ostolaza, W. L. Vaz and F. M. Goni (1996). "Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers." Biophys J **71**(4): 1869-1876.
- Balakrishnan, L., C. Hughes and V. Koronakis (2001). "Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*." J Mol Biol **313**(3): 501-510.
- Balashova, N. V., R. Diaz, S. V. Balashov, J. A. Crosby and S. C. Kachlany (2006). "Regulation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron." J Bacteriol **188**(24): 8658-8661.
- Balashova, N. V., D. H. Park, J. K. Patel, D. H. Figurski and S. C. Kachlany (2007). "Interaction between leukotoxin and Cu,Zn superoxide dismutase in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ." Infect Immun **75**(9): 4490-4497.
- Balashova, N. V., C. Shah, J. K. Patel, S. Megalla and S. C. Kachlany (2009). "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LtxC is required for leukotoxin activity and initial interaction between toxin and host cells." Gene **443**(1-2): 42-47.

Balsalobre, C., J. M. Silvan, S. Berglund, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin and S. N. Wai (2006). "Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*." Mol Microbiol **59**(1): 99-112.

Barcena-Uribarri, I., R. Benz, M. Winterhalter, E. Zakharian and N. Balashova (2015). "Pore forming activity of the potent RTX-toxin produced by pediatric pathogen *Kingella kingae*: Characterization and comparison to other RTX-family members." Biochim Biophys Acta **1848**(7): 1536-1544.

Basar, T., V. Havlicek, S. Bezouskova, M. Hackett and P. Sebo (2001). "Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC." J Biol Chem **276**(1): 348-354.

Bauer, M. E. and R. A. Welch (1996a). "Association of RTX toxins with erythrocytes." Infect Immun **64**(11): 4665-4672.

Bauer, M. E. and R. A. Welch (1996b). "Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Infect Immun **64**(1): 167-175.

Baumann, U., M. Bauer, S. Letoffe, P. Delepelaire and C. Wandersman (1995). "Crystal structure of a complex between *Serratia marcescens* metallo-protease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi*." J Mol Biol **248**(3): 653-661.

Bechinger, B. and K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." Biochim Biophys Acta **1758**(9): 1529-1539.

Belanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau and C. M. Dozois (2011). "*Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*." FEMS Immunol Med Microbiol **62**(1): 1-10.

Benz, R., A. Dobereiner, A. Ludwig and W. Goebel (1992). "Haemolysin of *Escherichia coli*: comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins." FEMS Microbiol Immunol **5**(1-3): 55-62.

Bergthorsson, U. and H. Ochman (1998). "Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*." Mol Biol Evol **15**(1): 6-16.

Bielaszewska, M., T. Aldick, A. Bauwens and H. Karch (2014). "Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence." Int J Med Microbiol **304**(5-6): 521-529.

Bielaszewska, M., A. Bauwens, L. Greune, B. Kemper, U. Dobrindt, J. M. Geelen, K. S. Kim, M. A. Schmidt and H. Karch (2009). "Vacuolisation of human microvascular endothelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." Thromb Haemost **102**(6): 1080-1092.

Bielaszewska, M., C. Ruter, L. Kunsmann, L. Greune, A. Bauwens, W. Zhang, T. Kuczius, K. S. Kim, A. Mellmann, M. A. Schmidt and H. Karch (2013). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis." PLoS Pathog **9**(12): e1003797.

Bien, J., O. Sokolova and P. Bozko (2012). "Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage." Int J Nephrol **2012**: 681473.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.

Boardman, B. K., B. M. Meehan and K. J. Fullner Satchell (2007). "Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export." J Bacteriol **189**(5): 1827-1835.

Boardman, B. K. and K. J. Satchell (2004). "*Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly." J Bacteriol **186**(23): 8137-8143.

Boerlin, P., S. Chen, J. K. Colbourne, R. Johnson, S. De Grandis and C. Gyles (1998). "Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*." Infect Immun **66**(6): 2553-2561.

Bonacorsi, S. and E. Bingen (2005). "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 373-381.

Bowen, D. J., T. A. Rocheleau, C. K. Grutzmacher, L. Meslet, M. Valens, D. Marble, A. Dowling, R. Ffrench-Constant and M. A. Blight (2003). "Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from *Photobacterium*." Microbiology **149**(Pt 6): 1581-1591.

Brahamsha, B. (1996). "An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the nonflagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6504-6509.

Braun, V. (2003). "Iron uptake by *Escherichia coli*." Front Biosci **8**: s1409-1421.

Braun, V. and M. Braun (2002). "Iron transport and signaling in *Escherichia coli*." FEBS Lett **529**(1): 78-85.

Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge and R. Curtiss, 3rd (2001). "MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." Mol Microbiol **41**(2): 349-363.

Buchanan, S. K. (2001). "Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel." Trends Biochem Sci **26**(1): 3-6.

Cancino-Rodezno, A., C. Alexander, R. Villaseñor, S. Pacheco, H. Porta, Y. Pauchet, M. Soberón, S. S. Gill and A. Bravo (2010). "The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*." Insect biochemistry and molecular biology **40**(1): 58-63.

Caprioli, A., V. Falbo, L. G. Roda, F. M. Ruggeri and C. Zona (1983). "Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations." Infect Immun **39**(3): 1300-1306.

- Caza, M., A. Garenaux, F. Lepine and C. M. Dozois (2015). "Catecholate siderophore esterases Fes, IroD and IroE are required for salmochelins secretion following utilization, but only IroD contributes to virulence of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **97**(4): 717-732.
- Caza, M., F. Lepine and C. M. Dozois (2011). "Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **80**(1): 266-282.
- Caza, M., F. Lepine, S. Milot and C. M. Dozois (2008). "Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins." Infect Immun **76**(8): 3539-3549.
- Chanteloup, N. K., G. Porcheron, B. Delaleu, P. Germon, C. Schouler, M. Moulin-Schouleur and P. Gilot (2011). "The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly." Vet Microbiol **147**(3-4): 435-439.
- Chatterjee, R., S. Nag and K. Chaudhuri (2008). "Identification of a new RTX-like gene cluster in *Vibrio cholerae*." FEMS Microbiol Lett **284**(2): 165-171.
- Chevance, F. F. and K. T. Hughes (2008). "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine." Nat Rev Microbiol **6**(6): 455-465.
- Chow, K. H., T. K. Ng, K. Y. Yuen and W. C. Yam (2001). "Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR." J Clin Microbiol **39**(7): 2594-2597.
- Clarke, T. E., L. W. Tari and H. J. Vogel (2001). "Structural biology of bacterial iron uptake systems." Curr Top Med Chem **1**(1): 7-30.
- Colgan, R., L. E. Nicolle, A. McGlone and T. M. Hooton (2006). "Asymptomatic bacteriuria in adults." Am Fam Physician **74**(6): 985-990.
- Cordero, C. L., D. S. Kudryashov, E. Reisler and K. J. Satchell (2006). "The Actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin." J Biol Chem **281**(43): 32366-32374.
- Cortajarena, A. L., F. M. Goni and H. Ostolaza (2001). "Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes." J Biol Chem **276**(16): 12513-12519.
- Cortajarena, A. L., F. M. Goni and H. Ostolaza (2002). "His-859 is an essential residue for the activity and pH dependence of *Escherichia coli* RTX toxin alpha-hemolysin." J Biol Chem **277**(26): 23223-23229.
- Cortajarena, A. L., F. M. Goñi and H. Ostolaza (2003). "Asp-863 is a key residue for calcium-dependent activity of *Escherichia coli* RTX toxin α -haemolysin." FEBS Letters **546**(2-3): 271-275.
- Crepin, S., J. Harel and C. M. Dozois (2012a). "Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae." Appl Environ Microbiol **78**(17): 6001-6008.

- Crepin, S., S. Houle, M. E. Charbonneau, M. Mourez, J. Harel and C. M. Dozois (2012b). "Decreased expression of type 1 fimbriae by a *pst* mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection." Infect Immun **80**(8): 2802-2815.
- Crosa, J. H. and C. T. Walsh (2002). "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **66**(2): 223-249.
- Cudd, L., C. Clarke and K. Clinkenbeard (2003). "Contribution of intracellular calcium stores to an increase in cytosolic calcium concentration induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin." FEMS Microbiol Lett **225**(1): 23-27.
- Dahler, G. S., F. Barras and N. T. Keen (1990). "Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16." J Bacteriol **172**(10): 5803-5815.
- Darfeuille-Michaud, A. (2002). "Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease." Int J Med Microbiol **292**(3-4): 185-193.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle and J. Chen (2008). "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." Microbiol Mol Biol Rev **72**(2): 317-364, table of contents.
- Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-161.
- Deslandes, V., M. Denicourt, C. Girard, J. Harel, J. H. Nash and M. Jacques (2010). "Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the acute phase of a natural infection in pigs." BMC Genomics **11**: 98.
- Dhokal, B. K., R. R. Kulesus and M. A. Mulvey (2008). "Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*." Eur J Clin Invest **38 Suppl 2**: 2-11.
- Dhokal, B. K. and M. A. Mulvey (2012). "The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways." Cell Host Microbe **11**(1): 58-69.
- Dho-Moulin, M. and J. M. Fairbrother (1999). "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)." Vet Res **30**(2-3): 299-316.
- Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels and J. M. Fairbrother (1994). "Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*." Avian Dis **38**(2): 231-239.
- Dozois, C. M., F. Daigle and R. Curtiss, 3rd (2003). "Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 247-252.

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels and R. Curtiss, 3rd (2000). "Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region." Infect Immun **68**(7): 4145-4154.

Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel and M. Bosse (1992). "pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys." Infect Immun **60**(7): 2648-2656.

Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh and J. M. Fairbrother (1995). "Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry." Vet Microbiol **45**(4): 297-309.

Duchaud, E., C. Rusniok, L. Frangeul, C. Buchrieser, A. Givaudan, S. Taourit, S. Bocs, C. Boursaux-Eude, M. Chandler, J. F. Charles, E. Dassa, R. Derose, S. Derzelle, G. Freyssinet, S. Gaudriault, C. Medigue, A. Lanois, K. Powell, P. Siguier, R. Vincent, V. Wingate, M. Zouine, P. Glaser, N. Boemare, A. Danchin and F. Kunst (2003). "The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*." Nat Biotechnol **21**(11): 1307-1313.

Duong, F., A. Lazdunski, B. Cami and M. Murgier (1992). "Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways." Gene **121**(1): 47-54.

Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard and E. Denamur (2001). "Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations." Microbiology **147**(Pt 6): 1671-1676.

Dutta, P. R., R. Cappello, F. Navarro-Garcia and J. P. Nataro (2002). "Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae." Infect Immun **70**(12): 7105-7113.

Eberspacher, B., F. Hugo and S. Bhakdi (1989). "Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin." Infect Immun **57**(3): 983-988.

Farthing, M. J. (2004). "Bugs and the gut: an unstable marriage." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 233-239.

Fine, D. H., J. B. Kaplan, S. C. Kachlany and H. C. Schreiner (2006). "How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : A model for infectious diseases." Periodontol 2000 **42**: 114-157.

Finnie, C., A. Zorreguieta, N. M. Hartley and J. A. Downie (1998). "Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif." J Bacteriol **180**(7): 1691-1699.

Fiser, R. and I. Konopasek (2009). "Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis* ." Biochim Biophys Acta **1788**(6): 1249-1254.

- Fong, K. P., W. O. Chung, R. J. Lamont and D. R. Demuth (2001). "Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS." Infect Immun **69**(12): 7625-7634.
- Foote, S. J., J. T. Bosse, A. B. Bouevitch, P. R. Langford, N. M. Young and J. H. Nash (2008). "The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b)." J Bacteriol **190**(4): 1495-1496.
- Ford, M. J., J. F. Nomellini and J. Smit (2007). "S-layer anchoring and localization of an S-layer-associated protease in *Caulobacter crescentus*." J Bacteriol **189**(6): 2226-2237.
- Foxman, B. (2002). "Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs." Am J Med **113 Suppl 1A**: 5S-13S.
- Frank, C., M. S. Faber, M. Askar, H. Bernard, A. Fruth, A. Gilsdorf, M. Hohle, H. Karch, G. Krause, R. Prager, A. Spode, K. Stark, D. Werber and H. U. S. i. team (2011). "Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011." Euro Surveill **16**(21).
- Frey, J. (2011). "The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic Pasteurellaceae." Vet Microbiol **153**(1-2): 51-58.
- Frey, J. and P. Kuhnert (2002). "RTX toxins in Pasteurellaceae." Int J Med Microbiol **292**(3-4): 149-158.
- Garenaux, A., M. Caza and C. M. Dozois (2011). "The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*." Vet Microbiol **153**(1-2): 89-98.
- Gehring, A. M., K. A. Bradley and C. T. Walsh (1997). "Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate." Biochemistry **36**(28): 8495-8503.
- Gehring, A. M., I. Mori and C. T. Walsh (1998). "Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF." Biochemistry **37**(8): 2648-2659.
- Ghigo, J. M. and C. Wandersman (1992). "Cloning, nucleotide sequence and characterization of the gene encoding the *Erwinia chrysanthemi* B374 PrtA metalloprotease: a third metalloprotease secreted via a C-terminal secretion signal." Mol Gen Genet **236**(1): 135-144.
- Ghunaim, H., M. A. Abu-Madi and S. Kariyawasam (2014). "Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations." Vet Microbiol **172**(1-2): 13-22.
- Gilson, L., H. K. Mahanty and R. Kolter (1990). "Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V." EMBO J **9**(12): 3875-3884.
- Gimenez-Lirola, L. G., Y. H. Jiang, D. Sun, H. Hoang, K. J. Yoon, P. G. Halbur and T. Opriessnig (2014). "Simultaneous detection of antibodies against Apx toxins ApxI, ApxII, ApxIII, and ApxIV in pigs with known and unknown *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposure using a multiplexing liquid array platform." Clin Vaccine Immunol **21**(1): 85-95.

- Glode, M. P., A. Sutton, E. R. Moxon and J. B. Robbins (1977). "Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1." Infect Immun **16**(1): 75-80.
- Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd and M. S. Brown (2006). "Protein sensors for membrane sterols." Cell **124**(1): 35-46.
- Guermontprez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant and C. Leclerc (2001). "The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18)." J Exp Med **193**(9): 1035-1044.
- Gur, C., S. Copenhagen-Glazer, S. Rosenberg, R. Yamin, J. Enk, A. Glasner, Y. Bar-On, O. Fleissig, R. Naor, J. Abed, D. Mevorach, Z. Granot, G. Bachrach and O. Mandelboim (2013). "Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells." Cell Host Microbe **14**(6): 664-674.
- Gurcel, L., L. Abrami, S. Girardin, J. Tschopp and F. G. van der Goot (2006). "Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival." Cell **126**(6): 1135-1145.
- Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro and H. L. Mobley (2000). "Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **38**(1): 53-66.
- Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones and H. L. Mobley (2002). "Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells." Infect Immun **70**(8): 4539-4546.
- Gyles, C. L. (1994). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, CAB International.
- Hacker, J. and J. B. Kaper (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." Annu Rev Microbiol **54**: 641-679.
- Hackett, M., C. B. Walker, L. Guo, M. C. Gray, S. Van Cuyk, A. Ullmann, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. L. Hewlett and P. Sebo (1995). "Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*." J Biol Chem **270**(35): 20250-20253.
- Hagan, E. C. and H. L. T. Mobley (2009). "Heme acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection." Molecular microbiology **71**(1): 79-91.
- Hagberg, L., I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling and C. Svanborg Eden (1983). "Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin." Infect Immun **40**(1): 273-283.
- Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch and G. Winkelmann (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**(7): 3677-3682.

- Harshman, S. (1988). Microbial Toxins : Tools in Enzymology. New York, Academic Press.
- Haubek, D., A. Havemose-Poulsen and J. Westergaard (2006). "Aggressive periodontitis in a 16-year-old Ghanaian adolescent, the original source of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain HK1651 - a 10-year follow up." Int J Paediatr Dent **16**(5): 370-375.
- Havlicek, V., L. Higgins, W. Chen, P. Halada, P. Sebo, H. Sakamoto and M. Hackett (2001). "Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9." J Mass Spectrom **36**(4): 384-391.
- Heesemann, J., K. Hantke, T. Vocke, E. Saken, A. Rakin, I. Stojiljkovic and R. Berner (1993). "Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity." Mol Microbiol **8**(2): 397-408.
- Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Lockett, D. E. Johnson and H. L. Mobley (2004). "Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection." Infect Immun **72**(1): 593-597.
- Heinemann, J. A. and R. A. Bungard (2006). Horizontal Gene Transfer. Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez and D. Ala'Aldeen (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- Herlax, V., S. Mate, O. Rimoldi and L. Bakas (2009). "Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process." J Biol Chem **284**(37): 25199-25210.
- Hicks, S., D. C. Candy and A. D. Phillips (1996). "Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro." Infect Immun **64**(11): 4751-4760.
- Hildebrand, F., A. Meyer and A. Eyre-Walker (2010). "Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria." PLoS Genet **6**(9): e1001107.
- Hoiczyk, E. (2000). "Gliding motility in cyanobacterial: observations and possible explanations." Arch Microbiol **174**(1-2): 11-17.
- Holland, I. B., L. Schmitt and J. Young (2005). "Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review)." Mol Membr Biol **22**(1-2): 29-39.
- Hong, Y. Q. and B. Ghebrehiwet (1992). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3." Clin Immunol Immunopathol **62**(2): 133-138.
- Hooton, T. M., C. Winter, F. Tiu and W. E. Stamm (1996). "Association of acute cystitis with the stage of the menstrual cycle in young women." Clin Infect Dis **23**(3): 635-636.

- Huffman, D. L., L. Abrami, R. Sasik, J. Corbeil, F. G. van der Goot and R. V. Aroian (2004). "Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 10995-11000.
- Ikaheimo, R., A. Siitonen, T. Heiskanen, U. Karkkainen, P. Kuosmanen, P. Lipponen and P. H. Makela (1996). "Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women." Clin Infect Dis **22**(1): 91-99.
- Inoue, T., I. Tanimoto, T. Tada, T. Ohashi, K. Fukui and H. Ohta (2001). "Fermentable-sugar-level-dependent regulation of leukotoxin synthesis in a variably toxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ." Microbiology **147**(Pt 10): 2749-2756.
- Iyoda, S., N. Honda, T. Saitoh, K. Shimuta, J. Terajima, H. Watanabe and M. Ohnishi (2011). "Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Infect Immun **79**(11): 4628-4637.
- Johnson, J. R. (1991). "Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection." Clin Microbiol Rev **4**(1): 80-128.
- Johnson, J. R., S. Jelacic, L. M. Schoening, C. Clabots, N. Shaikh, H. L. Mobley and P. I. Tarr (2005). "The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection." Infect Immun **73**(2): 965-971.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo (2002). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". " J Lab Clin Med **139**(3): 155-162.
- Johnson, T. J., S. J. Johnson and L. K. Nolan (2006a). "Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids." J Bacteriol **188**(16): 5975-5983.
- Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson and L. K. Nolan (2006b). "DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains." J Bacteriol **188**(2): 745-758.
- Jones, H. E., I. B. Holland, H. L. Baker and A. K. Campbell (1999). "Slow changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium." Cell Calcium **25**(3): 265-274.
- Jones, P. M., M. L. O'Mara and A. M. George (2009). "ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma." Trends Biochem Sci **34**(10): 520-531.
- Joseph, S., H. Sonbol, S. Hariri, P. Desai, M. McClelland and S. J. Forsythe (2012). "Diversity of the Cronobacter genus as revealed by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **50**(9): 3031-3039.
- Justice, S. S., C. Hung, J. A. Theriot, D. A. Fletcher, G. G. Anderson, M. J. Footer and S. J. Hultgren (2004). "Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1333-1338.
- Kanonenberg, K., C. K. Schwarz and L. Schmitt (2013). "Type I secretion systems - a story of appendices." Res Microbiol **164**(6): 596-604.

- Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140.
- Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric and C. Lim (1983). "Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools." Lancet **1**(8325): 619-620.
- Kawai, E., H. Akatsuka, A. Idei, T. Shibatani and K. Omori (1998). "*Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system." Mol Microbiol **27**(5): 941-952.
- Kawai, E., A. Idei, H. Kumura, K. Shimazaki, H. Akatsuka and K. Omori (1999). "The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33." Biochim Biophys Acta **1446**(3): 377-382.
- Kelk, P., R. Claesson, C. Chen, A. Sjostedt and A. Johansson (2008). "IL-1beta secretion induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin." Int J Med Microbiol **298**(5-6): 529-541.
- Kelk, P., A. Johansson, R. Claesson, L. Hanstrom and S. Kalfas (2003). "Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin." Infect Immun **71**(8): 4448-4455.
- Kesty, N. C., K. M. Mason, M. Reedy, S. E. Miller and M. J. Kuehn (2004). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells." EMBO J **23**(23): 4538-4549.
- Kloft, N., T. Busch, C. Neukirch, S. Weis, F. Boukhallouk, W. Bobkiewicz, I. Cibis, S. Bhakdi and M. Husmann (2009). "Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium." Biochem Biophys Res Commun **385**(4): 503-506.
- Kolodrubetz, D., L. Phillips, C. Jacobs, A. Burgum and E. Kraig (2003). "Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is ArcA/FnrA-independent and requires a novel promoter element." Res Microbiol **154**(9): 645-653.
- Koronakis, E., C. Hughes, I. Milisav and V. Koronakis (1995). "Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB." Mol Microbiol **16**(1): 87-96.
- Koronakis, V., C. Hughes and E. Koronakis (1991). "Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes." EMBO J **10**(11): 3263-3272.
- Koronakis, V., C. Hughes and E. Koronakis (1993). "ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB." Mol Microbiol **8**(6): 1163-1175.
- Koschinski, A., H. Repp, B. Unver, F. Dreyer, D. Brockmeier, A. Valeva, S. Bhakdi and I. Walev (2006). "Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells--the pore is on its own." FASEB J **20**(7): 973-975.

- Kostakioti, M. and C. Stathopoulos (2004). "Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Infect Immun **72**(10): 5548-5554.
- Koster, W. (2001). "ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12." Res Microbiol **152**(3-4): 291-301.
- Kreger, A. S. and L. D. Gray (1978). "Purification of *Pseudomonas aeruginosa* proteases and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage." Infect Immun **19**(2): 630-648.
- Kudryashov, D. S., C. L. Cordero, E. Reisler and K. J. Satchell (2008). "Characterization of the enzymatic activity of the actin cross-linking domain from the *Vibrio cholerae* MARTX Vc toxin." J Biol Chem **283**(1): 445-452.
- Kuhnert, P. and H. Christensen (2008). Pasteurellaceae : biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Kuhnert, P., J. Rohde and B. M. Korczak (2011). "A new variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 3 lacking the entire apxII operon." J Vet Diagn Invest **23**(3): 556-559.
- Kuhnert, P., Y. Schlatter and J. Frey (2005). "Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitonisillarum*"." Vet Microbiol **107**(3-4): 225-232.
- Kuhnert, P., E. Scholten, S. Haefner, D. Mayor and J. Frey (2010). "Basfia succiniciproducens gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae isolated from bovine rumen." Int J Syst Evol Microbiol **60**(Pt 1): 44-50.
- La Ragione, R. M., W. A. Cooley and M. J. Woodward (2000). "The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants." J Med Microbiol **49**(4): 327-338.
- La Ragione, R. M. and M. J. Woodward (2002). "Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia." Research in Veterinary Science **73**(1): 27-35.
- LaGier, M. J. and D. S. Threadgill (2008). "Identification of novel genes in the oral pathogen *Campylobacter rectus*." Oral Microbiol Immunol **23**(5): 406-412.
- Lally, E. T., E. E. Golub and I. R. Kieba (1994). "Identification and immunological characterization of the domain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin that determines its specificity for human target cells." J Biol Chem **269**(49): 31289-31295.
- Lally, E. T., I. R. Kieba, A. Sato, C. L. Green, J. Rosenbloom, J. Korostoff, J. F. Wang, B. J. Shenker, S. Ortlepp, M. K. Robinson and P. C. Billings (1997). "RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells." J Biol Chem **272**(48): 30463-30469.
- Landraud, L., M. Gibert, M. R. Popoff, P. Boquet and M. Gauthier (2003). "Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein." Mol Microbiol **47**(6): 1653-1667.

- Lane, M. C., C. J. Alteri, S. N. Smith and H. L. Mobley (2007). "Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16669-16674.
- Lassalle, F., S. Perian, T. Bataillon, X. Nesme, L. Duret and V. Daubin (2015). "GC-Content evolution in bacterial genomes: the biased gene conversion hypothesis expands." PLoS Genet **11**(2): e1004941.
- Lawrence, J. G. and H. Ochman (1998). "Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9413-9417.
- Lecher, J., C. K. Schwarz, M. Stoldt, S. H. Smits, D. Willbold and L. Schmitt (2012). "An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain." Structure **20**(10): 1778-1787.
- Lee, B. C., J. H. Lee, M. W. Kim, B. S. Kim, M. H. Oh, K. S. Kim, T. S. Kim and S. H. Choi (2008). "*Vibrio vulnificus* rtxE is important for virulence, and its expression is induced by exposure to host cells." Infect Immun **76**(4): 1509-1517.
- Lee, J. H., M. W. Kim, B. S. Kim, S. M. Kim, B. C. Lee, T. S. Kim and S. H. Choi (2007). "Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* rtxA essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice." J Microbiol **45**(2): 146-152.
- Leite, F., J. F. Brown, M. J. Sylte, R. E. Briggs and C. J. Czuprynski (2000). "Recombinant bovine interleukin-1 β amplifies the effects of partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on bovine neutrophils in a β (2)-integrin-dependent manner." Infect Immun **68**(10): 5581-5586.
- Lemonnier, M., L. Landraud and E. Lemichez (2007). "Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology." FEMS Microbiol Rev **31**(5): 515-534.
- Letoffe, S., P. Delepelaire and C. Wandersman (1996). "Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding." EMBO J **15**(21): 5804-5811.
- Leveille, S., M. Caza, J. R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri and C. M. Dozois (2006). "Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor." Infect Immun **74**(6): 3427-3436.
- Li, H., A. Granat, V. Stewart and J. R. Gillespie (2008a). "RpoS, H-NS, and DsrA influence EHEC hemolysin operon (ehxCABD) transcription in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933." FEMS Microbiol Lett **285**(2): 257-262.
- Li, L., J. L. Rock and D. R. Nelson (2008b). "Identification and characterization of a repeat-in-toxin gene cluster in *Vibrio anguillarum*." Infect Immun **76**(6): 2620-2632.
- Lievin-Le Moal, V., Y. Comenge, V. Ruby, R. Amsellem, V. Nicolas and A. L. Servin (2011). "Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment." Cell Microbiol **13**(7): 992-1013.
- Lim, K. B., C. R. Walker, L. Guo, S. Pellett, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. L. Hewlett, A. Ludwig, W. Goebel, R. A. Welch and M. Hackett (2000). "*Escherichia coli* alpha-

hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids." J Biol Chem **275**(47): 36698-36702.

Linhartova, I., L. Bumba, J. Masin, M. Basler, R. Osicka, J. Kamanova, K. Prochazkova, I. Adkins, J. Hejnova-Holubova, L. Sadilkova, J. Morova and P. Sebo (2010). "RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism." FEMS Microbiol Rev **34**(6): 1076-1112.

Liu, M., A. F. Alice, H. Naka and J. H. Crosa (2007). "The HlyU protein is a positive regulator of rtxA1, a gene responsible for cytotoxicity and virulence in the human pathogen *Vibrio vulnificus*." Infect Immun **75**(7): 3282-3289.

Loomes, L. M., M. A. Kerr and B. W. Senior (1993). "The cleavage of immunoglobulin G in vitro and in vivo by a proteinase secreted by the urinary tract pathogen *Proteus mirabilis*." J Med Microbiol **39**(3): 225-232.

Ludwig, A., C. von Rhein, S. Bauer, C. Huttinger and W. Goebel (2004). "Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains." J Bacteriol **186**(16): 5311-5320.

Lupardus, P. J., A. Shen, M. Bogyo and K. C. Garcia (2008). "Small molecule-induced allosteric activation of the *Vibrio cholerae* RTX cysteine protease domain." Science **322**(5899): 265-268.

Macnab, R. M. (1999). "The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus." J Bacteriol **181**(23): 7149-7153.

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

Mahillon, J., C. Léonard and M. Chandler (1999). "IS elements as constituents of bacterial genomes." Research in Microbiology **150**(9-10): 675-687.

Marciel, A. M. and S. K. Highlander (2001). "Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription." Infect Immun **69**(10): 6231-6239.

Marrs, C. F., L. Zhang and B. Foxman (2005). "*Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?" FEMS Microbiol Lett **252**(2): 183-190.

Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." Trends Immunol **26**(8): 447-454.

Masin, J., M. Basler, O. Knapp, M. El-Azami-El-Idrissi, E. Maier, I. Konopasek, R. Benz, C. Leclerc and P. Sebo (2005). "Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells." Biochemistry **44**(38): 12759-12766.

Masin, J., I. Konopasek, J. Svobodova and P. Sebo (2004). "Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes." Biochim Biophys Acta **1660**(1-2): 144-154.

- Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers and M. Arguin (2007). "Small RNAs controlling iron metabolism." Curr Opin Microbiol **10**(2): 140-145.
- Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode and A. Fasano (1998). ""Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3943-3948.
- May, M., A. J. Daley, S. Donath, D. Isaacs and I. Australasian Study Group for Neonatal (2005). "Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **90**(4): F324-327.
- McCarren, J., J. Heuser, R. Roth, N. Yamada, M. Martone and B. Brahamsha (2005). "Inactivation of *swmA* results in the loss of an outer cell layer in a swimming *Synechococcus* strain." J Bacteriol **187**(1): 224-230.
- McCarthy, C. N., R. G. Woods and I. R. Beacham (2004). "Regulation of the *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by *ompR-envZ*." FEMS Microbiol Lett **241**(2): 243-248.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss Iii, B. Lehoux and J. M. Fairbrother (2003a). "Role of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Bacterial Interaction with Chicken Heterophils and Macrophages." Infection and Immunity **71**(1): 494-503.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels and J. M. Fairbrother (2003b). "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity." Infect Immun **71**(1): 536-540.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux and J. M. Fairbrother (2003c). "Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages." Infect Immun **71**(1): 494-503.
- Menestrina, G., C. Moser, S. Pellet and R. Welch (1994). "Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family." Toxicology **87**(1-3): 249-267.
- Miller, M. C., J. D. Fetherston, C. L. Pickett, A. G. Bobrov, R. H. Weaver, E. DeMoll and R. D. Perry (2010). "Reduced synthesis of the Ybt siderophore or production of aberrant Ybt-like molecules activates transcription of yersiniabactin genes in *Yersinia pestis*." Microbiology **156**(Pt 7): 2226-2238.
- Miyoshi, S. and S. Shinoda (2000). "Microbial metalloproteases and pathogenesis." Microbes Infect **2**(1): 91-98.
- Moayeri, M. and R. A. Welch (1994). "Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin." Infect Immun **62**(10): 4124-4134.

- Moayeri, M. and R. A. Welch (1997). "Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin." Infect Immun **65**(6): 2233-2239.
- Mobley, H., M. Donnenberg and E. Hagan (2009). "Uropathogenic *Escherichia coli*." EcoSal Plus.
- Morova, J., R. Osicka, J. Masin and P. Sebo (2008). "RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5355-5360.
- Muller, C. M., U. Dobrindt, G. Nagy, L. Emody, B. E. Uhlin and J. Hacker (2006). "Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(15): 5428-5438.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser and S. J. Hultgren (1998). "Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*." Science **282**(5393): 1494-1497.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling and S. J. Hultgren (2001). "Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection." Infect Immun **69**(7): 4572-4579.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, J. J. Martinez and S. J. Hultgren (2000). "Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8829-8835.
- Muto, A. and S. Osawa (1987). "The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 166-169.
- Nagahata, H. (2004). "Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review." J Vet Med Sci **66**(12): 1475-1482.
- Nagamatsu, K., T. J. Hannan, R. L. Guest, M. Kostakioti, M. Hadjifrangiskou, J. Binkley, K. Dodson, T. L. Raivio and S. J. Hultgren (2015). "Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(8): E871-880.
- Nakahama, K., K. Yoshimura, R. Marumoto, M. Kikuchi, I. S. Lee, T. Hase and H. Matsubara (1986). "Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene." Nucleic Acids Res **14**(14): 5843-5855.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **11**(1): 142-201.
- Neidhardt, F. C. and R. Curtiss (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ASM Press.
- Nieto, J. M., M. Mourino, C. Balsalobre, C. Madrid, A. Prenafeta, F. J. Munoa and A. Juarez (1997). "Construction of a double hha hns mutant of *Escherichia coli*: effect on DNA supercoiling and alpha-haemolysin production." FEMS Microbiol Lett **155**(1): 39-44.
- Ochman, H. and R. K. Selander (1984). "Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations." J Bacteriol **157**(2): 690-693.

- Olson, R. and E. Gouaux (2005). "Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore." J Mol Biol **350**(5): 997-1016.
- Ostolaza, H., L. Bakas and F. M. Goni (1997). "Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin." J Membr Biol **158**(2): 137-145.
- Ostolaza, H., B. Bartolome, I. Ortiz de Zarate, F. de la Cruz and F. M. Goni (1993). "Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin." Biochim Biophys Acta **1147**(1): 81-88.
- Oswald, C., I. B. Holland and L. Schmitt (2006). "The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us?" Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **372**(6): 385-399.
- Otto, B. R., S. J. van Dooren, C. M. Dozois, J. Luirink and B. Oudega (2002). "*Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*." Infect Immun **70**(1): 5-10.
- Parreira, V. R. and C. L. Gyles (2003). "A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin." Infect Immun **71**(9): 5087-5096.
- Parthasarathy, G., Y. Yao and K. S. Kim (2007). "Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells." Infect Immun **75**(6): 2937-2945.
- Poolman, J. T. and M. Wacker (2015). "Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field." J Infect Dis.
- Porcheron, G., R. Habib, S. Houle, M. Caza, F. Lepine, F. Daigle, E. Masse and C. M. Dozois (2014). "The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **82**(12): 5056-5068.
- Porta, H., A. Cancino-Rodezno, M. Soberon and A. Bravo (2011). "Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins." Peptides **32**(3): 601-606.
- Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize and J. M. Fairbrother (1997). "Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*." Microb Pathog **22**(6): 331-341.
- Provence, D. L. and R. Curtiss, 3rd (1994). "Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Infect Immun **62**(4): 1369-1380.
- Raz, R. (2003). "Asymptomatic bacteriuria. Clinical significance and management." Int J Antimicrob Agents **22 Suppl 2**: 45-47.

- Restieri, C., G. Garriss, M. C. Locas and C. M. Dozois (2007). "Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains." Appl Environ Microbiol **73**(5): 1553-1562.
- Rimsky, S. (2004). "Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure." Curr Opin Microbiol **7**(2): 109-114.
- Robertson, K. P., C. J. Smith, A. M. Gough and E. R. Rocha (2006). "Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB." Infect Immun **74**(4): 2304-2316.
- Roche, E. D. and C. T. Walsh (2003). "Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis." Biochemistry **42**(5): 1334-1344.
- Ronald, A. (2002). "The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens." Am J Med **113 Suppl 1A**: 14S-19S.
- Ronald, A. (2003). "The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens." Dis Mon **49**(2): 71-82.
- Roos, V., E. M. Nielsen and P. Klemm (2006a). "Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition." FEMS Microbiol Lett **262**(1): 22-30.
- Roos, V., M. A. Schembri, G. C. Ulett and P. Klemm (2006b). "Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the foc locus and is unable to express F1C fimbriae." Microbiology **152**(Pt 6): 1799-1806.
- Ruiz-Perez, F., R. Wahid, C. S. Faherty, K. Kolappaswamy, L. Rodriguez, A. Santiago, E. Murphy, A. Cross, M. B. Szein and J. P. Nataro (2011). "Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(31): 12881-12886.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson (2000). "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC." J Infect Dis **181**(5): 1753-1754.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson (2003). "Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem." Microbes Infect **5**(5): 449-456.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard and J. R. Johnson (2002). "IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*." Infect Immun **70**(12): 7156-7160.
- Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd and C. M. Dozois (2008). "Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122." Infect Immun **76**(2): 601-611.
- Saitoh, T., S. Iyoda, S. Yamamoto, Y. Lu, K. Shimuta, M. Ohnishi, J. Terajima and H. Watanabe (2008). "Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively

regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J Bacteriol **190**(14): 4822-4830.

Sakaitani, M., F. Rusnak, N. R. Quinn, C. Tu, T. B. Frigo, G. A. Berchtold and C. T. Walsh (1990). "Mechanistic studies on trans-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (Ent A) in the biosynthesis of the iron chelator enterobactin." Biochemistry **29**(29): 6789-6798.

Sanchez-Magraner, L., A. R. Viguera, M. Garcia-Pacios, M. P. Garcillan, J. L. Arrondo, F. de la Cruz, F. M. Goni and H. Ostolaza (2007). "The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein." J Biol Chem **282**(16): 11827-11835.

Sasaki, H., H. Ishikawa, T. Sato, S. Sekiguchi, H. Amao, E. Kawamoto, T. Matsumoto and K. Shirama (2011). "Molecular and virulence characteristics of an outer membrane-associated RTX exoprotein in *Pasteurella pneumotropica*." BMC Microbiol **11**: 55.

Satchell, K. J. (2007). "MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins." Infect Immun **75**(11): 5079-5084.

Satchell, K. J. (2011). "Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins." Annu Rev Microbiol **65**: 71-90.

Scheutz, F., E. M. Nielsen, J. Frimodt-Moller, N. Boisen, S. Morabito, R. Tozzoli, J. P. Nataro and A. Caprioli (2011). "Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011." Euro Surveill **16**(24).

Schmitt, L., H. Benabdelhak, M. A. Blight, I. B. Holland and M. T. Stubbs (2003). "Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains." J Mol Biol **330**(2): 333-342.

Schmitt, L. and R. Tampe (2002). "Structure and mechanism of ABC transporters." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 754-760.

Schoenhals, G. and C. Whitfield (1993). "Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with a shared complex surface pattern." J Bacteriol **175**(17): 5395-5402.

Sheahan, K. L. and K. J. Satchell (2007). "Inactivation of small Rho GTPases by the multifunctional RTX toxin from *Vibrio cholerae*." Cell Microbiol **9**(5): 1324-1335.

Shibuya, Y., T. Yamamoto, T. Morimoto, N. Nishino, T. Kambara and H. Okabe (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin." Biochim Biophys Acta **1077**(3): 316-324.

Sievert, D. M., P. Ricks, J. R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan, A. Kallen, B. Limbago, S. Fridkin, T. National Healthcare Safety Network and N. F. Participating (2013). "Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010." Infect Control Hosp Epidemiol **34**(1): 1-14.

- Siguier, P., J. Filee and M. Chandler (2006). "Insertion sequences in prokaryotic genomes." Curr Opin Microbiol **9**(5): 526-531.
- Sik Kim, K. (2006). "Meningitis-Associated *Escherichia coli*." EcoSal Plus.
- Simpson, K. W., B. Dogan, M. Rishniw, R. E. Goldstein, S. Klaessig, P. L. McDonough, A. J. German, R. M. Yates, D. G. Russell, S. E. Johnson, D. E. Berg, J. Harel, G. Bruant, S. P. McDonough and Y. H. Schukken (2006). "Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs." Infect Immun **74**(8): 4778-4792.
- Skals, M., N. R. Jorgensen, J. Leipziger and H. A. Praetorius (2009). "Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 4030-4035.
- Sleytr, U. B., E. M. Egelseer, N. Ilk, D. Pum and B. Schuster (2007). "S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit." FEBS J **274**(2): 323-334.
- Smit, J., H. Engelhardt, S. Volker, S. H. Smith and W. Baumeister (1992). "The S-layer of *Caulobacter crescentus*: three-dimensional image reconstruction and structure analysis by electron microscopy." J Bacteriol **174**(20): 6527-6538.
- Song, J., B. L. Bishop, G. Li, R. Grady, A. Stapleton and S. N. Abraham (2009). "TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(35): 14966-14971.
- Stanley, P., V. Koronakis and C. Hughes (1998). "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 309-333.
- Stathopoulos, C., D. L. Provenge and R. Curtiss, 3rd (1999). "Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters." Infect Immun **67**(2): 772-781.
- Strober, W. (2011). "Adherent-invasive *E. coli* in Crohn disease: bacterial "agent provocateur"." J Clin Invest **121**(3): 841-844.
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sutton, J. M., E. J. Lea and J. A. Downie (1994). "The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9990-9994.
- Syed, K. A., S. Beyhan, N. Correa, J. Queen, J. Liu, F. Peng, K. J. Satchell, F. Yildiz and K. E. Klose (2009). "The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors." J Bacteriol **191**(21): 6555-6570.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." Mol Biol Evol **30**(12): 2725-2729.
- Taxt, A., R. Aasland, H. Sommerfelt, J. Nataro and P. Puntervoll (2010). "Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target." Infect Immun **78**(5): 1824-1831.

- Tendeng, C. and P. N. Bertin (2003). "H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins." Trends Microbiol **11**(11): 511-518.
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes and V. Koronakis (1998). "Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore." EMBO J **17**(22): 6487-6496.
- Thanassi, D., S. Nuccio, S. Shu Kin So and A. Bäumlner (2007). "Fimbriae: Classification and Biochemistry." EcoSal Plus.
- Thomas, S., I. B. Holland and L. Schmitt (2014). "The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond." Biochim Biophys Acta **1843**(8): 1629-1641.
- Thompson, S. A. (2002). "Campylobacter surface-layers (S-layers) and immune evasion." Ann Periodontol **7**(1): 43-53.
- Toporowski, M. C., J. F. Nomellini, P. Awram and J. Smit (2004). "Two outer membrane proteins are required for maximal type I secretion of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein." J Bacteriol **186**(23): 8000-8009.
- Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch and S. M. Payne (2001). "TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse." Infect Immun **69**(10): 6179-6185.
- Trent, M. S., L. M. Worsham and M. L. Ernst-Fonberg (1998). "The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase." Biochemistry **37**(13): 4644-4652.
- Umelo-Njaka, E., W. H. Bingle, F. Borchani, K. D. Le, P. Awram, T. Blake, J. F. Nomellini and J. Smit (2002). "*Caulobacter crescentus* synthesizes an S-layer-editing metalloprotease possessing a domain sharing sequence similarity with its paracrystalline S-layer protein." J Bacteriol **184**(10): 2709-2718.
- Unhanand, M., M. M. Mustafa, G. H. McCracken, Jr. and J. D. Nelson (1993). "Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience." J Pediatr **122**(1): 15-21.
- Valdebenito, M., S. I. Muller and K. Hantke (2007). "Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin)." FEMS Microbiol Lett **277**(2): 182-187.
- Valens, M., A. C. Broutelle, M. Lefebvre and M. A. Blight (2002). "A zinc metalloprotease inhibitor, Inh, from the insect pathogen *Photobacterium luminescens*." Microbiology **148**(Pt 8): 2427-2437.
- Valeva, A., I. Walev, H. Kemmer, S. Weis, I. Siegel, F. Boukhallouk, T. M. Wassenaar, T. Chavakis and S. Bhakdi (2005). "Binding of *Escherichia coli* hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent." J Biol Chem **280**(44): 36657-36663.
- Vojtova-Vodolanova, J., M. Basler, R. Osicka, O. Knapp, E. Maier, J. Cerny, O. Benada, R. Benz and P. Sebo (2009). "Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella adenylate cyclase* toxin." FASEB J **23**(9): 2831-2843.

- Vojtova, J., J. Kamanova and P. Sebo (2006). "*Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense." Curr Opin Microbiol **9**(1): 69-75.
- Wassif, C., D. Cheek and R. Belas (1995). "Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*." J Bacteriol **177**(20): 5790-5798.
- Waters, V. L. and J. H. Crosa (1991). "Colicin V virulence plasmids." Microbiol Rev **55**(3): 437-450.
- Welch, R. A. (2001). "RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology." Curr Top Microbiol Immunol **257**: 85-111.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg and F. R. Blattner (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 17020-17024.
- Werner, J., A. M. Augustus and R. Misra (2003). "Assembly of TolC, a structurally unique and multifunctional outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **185**(22): 6540-6547.
- Westrop, G., K. Hormozi, N. da Costa, R. Parton and J. Coote (1997). "Structure-function studies of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* and the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* by heterologous C protein activation and construction of hybrid proteins." J Bacteriol **179**(3): 871-879.
- Whitfield, C. (2009). "Structure and Assembly of *Escherichia coli* Capsules." EcoSal Plus.
- Whitfield, C. and I. S. Roberts (1999). "Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **31**(5): 1307-1319.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus and M. A. Mulvey (2008). "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." Exp Mol Pathol **85**(1): 11-19.
- Wiles, T. J. and M. A. Mulvey (2013). "The RTX pore-forming toxin alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives." Future Microbiol **8**(1): 73-84.
- Williams, P. H. and N. H. Carbonetti (1986). "Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*." Infect Immun **51**(3): 942-947.
- Woods, R. G., M. Burger, C. A. Beven and I. R. Beacham (2001). "The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production." Microbiology **147**(Pt 2): 345-354.
- Worsham, L. M., K. G. Langston and M. L. Ernst-Fonberg (2005). "Thermodynamics of a protein acylation: activation of *Escherichia coli* hemolysin toxin." Biochemistry **44**(4): 1329-1337.

- Worsham, L. M., M. S. Trent, L. Earls, C. Jolly and M. L. Ernst-Fonberg (2001). "Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates *Escherichia coli* hemolysin toxin." Biochemistry **40**(45): 13607-13616.
- Wright, K. J., P. C. Seed and S. J. Hultgren (2005). "Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization." Infect Immun **73**(11): 7657-7668.
- Xie, J., B. Foxman, L. Zhang and C. F. Marrs (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**(7): 2434-2441.
- Xie, Y., K. J. Kim and K. S. Kim (2004). "Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier." FEMS Immunol Med Microbiol **42**(3): 271-279.
- Yagupsky, P. (2015). "*Kingella kingae*: carriage, transmission, and disease." Clin Microbiol Rev **28**(1): 54-79.
- Yan, Q., K. A. Power, S. Cooney, E. Fox, G. R. Gopinath, C. J. Grim, B. D. Tall, M. P. McCusker and S. Fanning (2013). "Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of *Cronobacter sakazakii* SP291: a persistent isolate cultured from a powdered infant formula production facility." Front Microbiol **4**: 256.
- Young, J. and I. B. Holland (1999). "ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 177-200.
- Zdziarski, J., C. Svanborg, B. Wullt, J. Hacker and U. Dobrindt (2008). "Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation?" Infect Immun **76**(2): 695-703.
- Zhang, Y., D. D. Bak, H. Heid and K. Geider (1999). "Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*." J Mol Biol **289**(5): 1239-1251.