#### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

#### THESE

#### Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

#### En Biologie et santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Florent Sebbane** 

Le 3 juin 2002

## Caractérisation génétique du locus uréase de *Yersinia pestis* et *Yersinia pseudotuberculosis*

Jury

M. le Professeur J.P. BOHIN
M. le Professeur G. CORNELIS
Rapporteur
Mme le Docteur A. LABIGNE
Rapporteur
M. le Docteur C. LOCHT
Examinateur
Mme le Docteur E. CARNIEL
Examinateur
M. le Professeur M. SIMONET
Directeur de thèse

nº Aleph 153218

## SOMMAIRE

Revue de la Littérature	7
Chapitre I. Les <i>Yersinia</i> : les agents pathogènes et leur	
rôle dans la physiopathologie de l'infection	10
I.1 Les souches pathogènes du genre Yersinia	11
I.1.A. Yersinia pestis, l'agent étiologique de la peste	11
I.1.B. Y. enterocolitica et Y. pseudotuberculosis,	
espèces entéro-pathogènes	13
I.2. Le pouvoir pathogène des <i>Yersinia</i>	14
I.2.A. La colonisation du tube digestif	15
I.2.A.1. La mobilité	15
I.2.A.2. Attachement aux cellules du tube digestif	17
Les pili Psa/Myf	17
La protéine YadA, une adhésine « afimbriale »	18
I.2.A.3. La sécrétion d'entérotoxines	19
I.2.A.4. Les Protéines d'invasion cellulaire et traversée du tube digestif	20
L'invasine	20
La protéine Ail	22
La protéine YadA	22
La protéine Pla	23
I.2.B. La survie dans les tissus	24
I.2.B.1. La résistance à la phagocytose	24
La génétique du virulon Yop	24
L'appareil de sécrétion	25
L'appareil de translocation	26
Les protéines chaperons	27
Les protéines effectrices	27

La régulation du système	28
L'étape transcriptionnelle	28
L'etape post-transcriptionnelle	29
Le modèle de la sécrétion	30
I.2.B.2. L'inhibition de la réponse inflammatoire de l'hôte	31
I.2.B.3. La résistance au complément	31
La protéine YadA, LPS et Ail	32
La capsule	33
I.2.C. La dissémination tissulaire	34
I.2.C.1. Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire	34
La protéine Pla	34
La phospholipase YlpA	35
I.2.C.2. L'acquisition du fer	36
Le système de capture Ybt	36
Le transporteur Yfe	37
Le système Hms	38
I.2.D. Les séquelles immunologiques	39
I.2.D.1. L'uréase	39
I.2.D.2. YadA et la fixation au collagène	40
I.2.D.3. Le superantigène	41
Chapitre II. L'uréase	42
II.1. L'uréase, une métallo-enzyme	43
II.1.A. La structure de l'uréase	44
II.1.B. Les Caractéristiques biochimiques de l'enzyme	46
II.1.C. La localisation cellulaire de l'enzyme	47
I1.1.D. L'activation de l'apoenzyme (apouréase)	47
La proteine UreE	48
La protéine UreG	50
II.2. La biosynthèse des uréases bactériennes	50
II.2.A. Les organisations génétiques des régions uréasiques	50

II.2.B. La régulation de l'activité uréolytique	53
La régulation par l'urée	53
La régulation par l'azote	54
La régulation par la densité cellulaire	56
La régulation par la température	56
La régulation par le pH	57
La régulation par les carbohydrates	58
La régulation par le nickel	59
II.3. L'uréase et le pouvoir pathogène bactérien	59
II.3.A. Les bactéries uréolytiques de la cavité buccale	60
II.3.B. H. pylori, une bactérie uréolytique pathogène de l'estomac	62
II.3.C. Les bactéries uréolytiques uropathogènes	66
II.3.D. Les bactéries uréolytiques responsables d'infections	
respiratoires	68
Chapite III. Les transporteurs de nickel	69
Chapite III. Les transporteurs de nickel III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )	69 70
Chapite III. Les transporteurs de nickel.         III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )         III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli.	69 70 70
Chapite III. Les transporteurs de nickel         III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )         III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli         III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens	69 70 70 72
Chapite III. Les transporteurs de nickel.         III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )         III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli.         III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens.         III.2. Les perméases au nickel.	<ol> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> </ol>
<ul> <li>Chapite III. Les transporteurs de nickel.</li> <li>III.1. Les transporteurs de type ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)</li> <li>III.1.A. Le transporteur Nik de <i>E. coli</i>.</li> <li>III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens.</li> <li>III.2. Les perméases au nickel.</li> <li>III.2.A. Les protéines de la famille HoxN.</li> </ul>	<ul> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> </ul>
<ul> <li>Chapite III. Les transporteurs de nickel</li> <li>III.1. Les transporteurs de type ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)</li> <li>III.1.A. Le transporteur Nik de <i>E. coli</i></li> <li>III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens</li> <li>III.2. Les perméases au nickel</li> <li>III.2.A. Les protéines de la famille HoxN</li> <li>III.2.B. Le cas particulier du transporteur de Bacillus sp.TB-90</li> </ul>	<ul> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> <li>74</li> </ul>
<ul> <li>Chapite III. Les transporteurs de nickel.</li> <li>III.1. Les transporteurs de type ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)</li> <li>III.1.A. Le transporteur Nik de <i>E. coli</i>.</li> <li>III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens.</li> <li>III.2. Les perméases au nickel.</li> <li>III.2.A. Les protéines de la famille HoxN.</li> <li>III.2.B. Le cas particulier du transporteur de <i>Bacillus</i> sp.TB-90.</li> <li>III.2.C. La topologie des perméases et motifs critiques pour</li> </ul>	<ol> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> <li>74</li> </ol>
Chapite III. Les transporteurs de nickel.         III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )         III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli.         III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens.         III.2. Les perméases au nickel.         III.2.A. Les protéines de la famille HoxN.         III.2.B. Le cas particulier du transporteur de Bacillus sp.TB-90.         III.2.C. La topologie des perméases et motifs critiques pour         le transport du nickel.	<ul> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> <li>74</li> <li>75</li> </ul>
<ul> <li>Chapite III. Les transporteurs de nickel.</li> <li>III.1. Les transporteurs de type ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)</li> <li>III.1.A. Le transporteur Nik de <i>E. coli</i></li> <li>III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens</li> <li>III.2. Les perméases au nickel.</li> <li>III.2.A. Les protéines de la famille HoxN</li> <li>III.2.B. Le cas particulier du transporteur de <i>Bacillus</i> sp.TB-90</li> <li>III.2.C. La topologie des perméases et motifs critiques pour le transport du nickel</li> <li>III.3. La régulation du transport du nickel</li> </ul>	<ul> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> <li>74</li> <li>75</li> <li>76</li> </ul>
Chapite III. Les transporteurs de nickel.         III.1. Les transporteurs de type ABC ( <u>ATP-Binding Cassette</u> )         III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli.         III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens.         III.2. Les perméases au nickel.         III.2.A. Les protéines de la famille HoxN.         III.2.B. Le cas particulier du transporteur de Bacillus sp.TB-90.         III.2.C. La topologie des perméases et motifs critiques pour         le transport du nickel.         III.3. La régulation du transport du nickel.	<ul> <li>69</li> <li>70</li> <li>70</li> <li>72</li> <li>73</li> <li>73</li> <li>74</li> <li>75</li> <li>76</li> <li>76</li> <li>76</li> </ul>

Chapitre IV. Les transporteurs d'urée	79
IV.1. La diffusion simple	80
IV.2. La diffusion facilitée	81
IV.2.A. Les transporteurs d'urée des eucaryotes	81
IV.2.B. Les transporteurs d'urée des procaryotes	82
Le canal à urée UreI	82
Le transporteur non spécifique GlpF	85
IV.3. Le transport actif	85
IV.3.A. Le transport d'urée chez les eucaryotes	85
IV.3.B. Le transporteur Fmd de Methylophilus methylotrophus	86

Travaux personnels	88
Publication n°1 :	90
Silencing and reactivation of urease in Yersinia pestis is determined by one G	
residue at a specific position in the <i>ureD</i> gene.	
Publication n°2 :	98
Genes Encoding Specific Nickel Transport Systems Flank the Chromosomal	
Urease Locus of Pathogenic Yersinia.	
Publication n°3 :	127
The Yersinia pseudotuberculosis Yut protein, a new type of urea transporter	
homologous to eukaryotic channels and functionnaly interchangeable in vitro	
with the Helicobacter pylori UreI protein.	

Discussion et perspectives	158
I. L'environnement des gènes ure de structure et auxiliaires	
des Yersinia	159

II. Les transporteurs de nickel 163
III. Le transporteur d'urée Yut 165
IV. La régulation de l'uréase chez Y. pseudotuberculosis 167
IV.A. Le rôle de la région de 179 pb entre <i>ureD</i> et <i>yut</i> 168
IV.B. Le rôle de la phase de croissance 168
IV.C. Le rôle du nickel 169
V. Le rôle de la région <i>ure</i> dans le cycle de vie170

Références bibl	iographiques 17
-----------------	-----------------

# Revue de la littérature

Les Yersinia sont des bacilles à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae répartis dans 11 espèces [1, 2]. Du point de vue médical, les Yersinia peuvent être classées en trois catégories. La première rassemble les espèces Y. pestis, Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica qui sont pathogènes pour l'Homme et l'animal [1, 2]. La deuxième catégorie regroupe Y. frederiksenii, Y. intermedia et Y. kristensenii, espèces à l'origine d'infections opportunistes. Enfin, la dernière inclut Y. mollaretti, Y. bercovieri, Y. aldovae, Y. rodhei, Y. ruckeri qui ne sont pas pathogènes pour l'Homme.

Le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S a montré que les *Yersinia* constituent un ensemble phylogénétique homogène formé de cinq sous-classes [3]. Deux des espèces pathogènes, *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*, sont fortement apparentées. En effet, les acides désoxyribonucléiques des deux bactéries hybrident à plus de 90%. De plus, la plupart des gènes homologues de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont identiques à plus de 97% [4-6]. A titre d'exemple, les gènes codant l'ARN ribosomal 16S présentent 99,7% d'identité [3]. Cette étroite liaison génétique résulte de l'émergence récente (1500 à 20000 ans) de *Y. pestis* à partir de *Y. pseudotuberculosis* [5].

Le réservoir des Yersinia est constitué par le sol, l'eau, les végétaux à partir desquels se contaminent les animaux domestiques et sauvages [7, 8]. Les Yersinia sont des coccobacilles à Gram négatif qui, à l'exception de Y. pestis, sont mobiles à 25°C (grâce à la présence des flagelles péritriches), et non capsulées [9, 10]. Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis et Y. pestis se multiplient à des températures variables, de 4°C à 42°C, et à des valeurs de pH comprises entre 5 à 9.6 [10]. Bien que la température optimale de croissance de ces trois espèces soit de 28°C, Y. pestis se distingue des deux autres bactéries par un temps de génération deux fois plus long (colonies bactériennes observées après 36 heures contre 24 heures pour Y. enterocolitica et Y. pseudotuberculosis) et par ses auxotrophies [10]. En effet, Y. pestis ne croît que dans des milieux supplémentés en glycine, phénylalanine, valine,

isoleucine et méthionine [10]. D'autres produits métaboliques permettent de différencier Y. *pestis* de son précurseur Y. *pseudotuberculosis*. Contrairement à Y. *pseudotuberculosis*, Y. *pestis* est incapable de fermenter le rhamnose ainsi que le mélibiose ou d'hydrolyser l'urée [10]. Cependant, dans certaines conditions, Y. *pestis* peut présenter certains traits phénotypiques de Y. *pseudotuberculosis* (hydrolyse de l'urée, fermentation du rhamnose et du mélibiose, prototrophie pour la phénylalanine, la méthionine et la glycine) [4, 10].

Contrairement à Y. pseudotuberculosis, Y. pestis et Y. enterocolitica présentent une importante variété métabolique d'une souche à l'autre. Ainsi, selon leur capacité à réduire les nitrates en nitrites et à fermenter le glycérol, les souches de Y. pestis sont subdivisées en 3 biovars : Antiqua, Medievalis et Orientalis [1, 2]. Cinq biovars de Y. enterocolitica ont été décrits, le biovar 1 de Y. enterocolitica est lui-même scindé en deux biogroupes, 1A et 1B [1].

# **Chapitre I**

# Les *Yersinia* : les agents pathogènes

# et

# leur rôle dans la

physiopathologie de l'infection



Figure 1. Distribution mondiale des foyers naturels de peste dans les populations de rongeurs d'après l'OMS (rapport 2000)



Figure 2. Nombre de cas de peste humaine dans le monde depuis 1985. D'après l'O.M.S 2000.

### I.1 Les souches pathogènes du genre Yersinia

#### I.1.A. Yersinia pestis, l'agent étiologique de la peste

La peste est une zoonose touchant principalement les rongeurs et cette maladie infectieuse n'est qu'accidentellement transmise à l'Homme. Elle est actuellement distribuée sur trois continents : l'Afrique, l'Asie et l'Amérique (Figure 1) et est considérée comme une maladie infectieuse humaine ré-émergente (Figure 2). Les rongeurs jouent un rôle prépondérant dans l'épidémiologie de la peste car ils constituent le principal réservoir de l'agent infectieux. Celui-ci est transmis entre les rongeurs et les autres animaux soit indirectement, par l'intermédiaire des puces, soit directement, par l'inhalation d'aérosols ou encore l'ingestion d'aliments contaminés (Figure 3). La contamination de l'Homme survient le plus souvent après piqûre par la puce du rat, *Xenopsylla cheopsis*.

L'insecte hématophage s'infecte après piqûre d'un hôte atteint de peste généralisée. Les bactéries ingérées lors du repas sanguin se multiplient dans le proventricule (dilatation située entre l'œsophage et l'estomac), et bloquent ainsi partiellement l'estomac. Lors d'une nouvelle piqûre, le sang aspiré est souillé par les bactéries au contact du « bouchon » proventriculaire ; ne pouvant être ingéré, il est alors régurgité au point de ponction. Affamée, la puce pique de manière réitérée, ce qui augmente l'efficacité de la transmission de la maladie. Parmi les 1500 espèces de puce, environ 80 seulement sont capables de transmettre le bacille de la peste d'un hôte à l'autre, avec toutefois une efficacité très variable [11]. Celle-ci dépendrait de la capacité du blocage du proventricule par *Y. pestis* [12]. Par exemple, *X. cheopsis* transmet *Y. pestis* plus efficacement que *Pulex irritans* (la puce de l'Homme) [2].

La peste bubonique est la forme classique de la maladie. Elle survient communément après piqure d'une puce infectée. La multiplication du bacille au point d'inoculation aboutit à la formation d'une phlyctène qui se nécrose progressivement formant alors une escarre noirâtre (charbon pesteux). Deux à huit jours après la piqure infectante, le bacille gagne, via la circulation lymphatique, le ganglion lymphatique proximal où il se multiplie. L'hôte infecté présente alors de la fièvre, des frissons, des céphalées, une asthénie, des vomissements et parfois une diarrhée. Le ganglion devient hypertrophié, très inflammatoire et extrêmement douloureux : c'est le bubon pesteux. Il siège habituellement à l'aine, aux aisselles et plus rarement au cou (Photo 1). Dans les formes non compliquées, les signes généraux régressent et la guérison survient après une longue période pendant laquelle le bubon suppure régulièrement. Souvent, la peste dite bubonique évolue vers une forme généralisée de la maladie par suite de la dissémination lymphatico-sanguine du bacille à partir du bubon. Les signes cliniques de la maladie associent alors un syndrome de coagulation intra-vasculaire disséminée, une défaillance fonctionnelle multi-viscérale, en particulier, une détresse respiratoire aiguë. En absence de traitement précoce, la mort survient dans près de 70% des cas dans les 2 à 4 jours suivant l'infestation du sujet.

La peste pulmonaire est la forme la plus grave de la maladie. Elle correspond à une atteinte des poumons consécutive à l'inhalation de gouttelettes de salive contenant *Y. pestis* émises par un malade (Figure 3). La période d'incubation est extrêmement courte, de l'ordre de quelques heures à deux jours. Le malade présente alors une fièvre élevée (40-41°C), une altération importante de l'état général, une toux, des hémoptysies, des douleurs thoraciques, et une dyspnée. En absence d'un traitement précoce (dans les 18 à 24 heures), la maladie évolue vers un collapsus cardio-vasculaire et un coma dont l'issue est généralement la mort.

#### I.1.B. Y. enterocolitica et Y. pseudotuberculosis, espèces entéro-pathogènes

Responsables de zoonoses, les espèces *pseudotuberculosis* et *enterocolitica* sont très répandues dans les régions tempérées du globe compte-tenu de leur capacité à survivre dans le sol et l'eau [13]. Le réservoir animal de ces deux bactéries est très étendu, comprenant aussi bien des espèces domestiques que sauvages [1, 13]. Les souches pathogènes (pour l'Homme) de *Y. enterocolitica* (biovar 1B) sont principalement isolées du porc [1, 13, 14]. L'homme s'infecte habituellement par voie orale, essentiellement lors de la consommation de produits d'origine porcine souillés. Plus rarement, cette contamination survient lors de contact avec un animal domestique hébergeant des *Yersinia* dans son tube digestif ou avec un sujet malade, voire porteur asymptomatique de *Yersinia* [15].

L'entérocolite et l'adénite mésentérique sont les deux principales manifestations cliniques de l'infection humaine par Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica. Y. enterocolitica est responsable des deux tiers des cas d'entérite du nourrisson et du jeune enfant. Y. pseudotuberculosis est préférentiellement impliquée dans l'adénite mésentérique de l'enfant de plus de 5 ans et de l'adulte jeune [1, 13].

L'entérocolite se traduit cliniquement par une diarrhée, une fièvre modérée, des vomissements et des douleurs abdominales. L'examen microscopique des selles montre habituellement la présence d'hématies et de leucocytes, témoignant de l'invasion de la muqueuse intestinale par les bactéries (processus « entéro-invasif ») [14]. Les manifestations cliniques régressent en une à trois semaines mais, l'excrétion des *Yersinia* dans les selles des malades peut parfois se prolonger pendant plusieurs semaines [15].

L'adénite mésentérique se manifeste cliniquement par un syndrome pseudo-appendiculaire dont la symptomatologie simule une appendicite aiguë (fièvre, douleur dans la fosse iliaque droite et vomissements) [1, 13]. La laparotomie révèle la présence de volumineuses adénopathies et un appendice sain ou quelquefois enflammé voire abcédé [16, 17]. De rares cas d'infection généralisée ont été observés, essentiellement chez des sujets débilités par une cirrhose, une malnutrition, un diabète, une hémochromatose, une thalassémie, une drépanocytose ou un cancer [14]. Lors de la septicémie, des abcès rénaux, hépatiques ou spléniques, une méningite ou une endocardite peuvent se développer [1].

Des complications cliniques d'origine immuno-allergique, dont la physiopathologie est encore mal comprise, peuvent survenir au décours de l'infection intestinale. Elles concernent les articulations, la peau et la thyroïde. Les arthrites réactionnelles sont dues à des dépôts de complexes immuns dans les articulations. Elles atteignent plus fréquemment les individus appartenant au groupe tissulaire d'histocompatibilité HLA B-27 [15, 18-21]. L'érythème noueux est la complication dermatologique des yersinioses la plus fréquente et elle affecte surtout la femme [13]. Enfin, l'existence de communautés antigéniques entre certaines protéines de *Y. enterocolitica* et de la thyroïde contribueraient au déclenchement de thyroïdite auto-immune [22].

### I.2. Le pouvoir pathogène des Yersinia

La voie principale d'infection de l'hôte de Y. pestis est sous-cutanée, par piqûre de puces. Après inoculation, la bactérie se multiplie localement, est drainée par la circulation lymphatique jusqu'au ganglion proche du point d'inoculation, puis se propage par voie lymphatico-sanguine dans tout l'organisme. Y. enterocolitica et Y. pseudotuberculosis (mais aussi parfois Y. pestis) infestent l'hôte par voie digestive. Après traversée de l'estomac, les Yersinia entéropathogènes s'attachent au mucus puis à la muqueuse intestinale. Attachée aux cellules intestinales, Y. enterocolitica sécrète une entérotoxine responsable en partie de la diarrhée. Reconnaissant des récepteurs à la surface de l'épithélium intestinal, Y.

*pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* traversent la muqueuse intestinale (*via* les cellules M), prolifèrent dans les plaques de Peyer puis, gagnent par voie lymphatique les ganglions mésentériques. A partir des ganglions mésentériques, les bactéries peuvent disséminer, par voie hématogène, dans les tissus profonds.

Bien que Y. pestis occasionne une pathologie infectieuse radicalement différente de celle induite par Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica, les trois espèces pathogènes de Yersinia partagent un grand nombre de facteurs de virulence. Ils sont codés par des gènes chromosomiques mais aussi, et surtout, portés par le plasmide pYV (70 kb) qui joue un rôle capital dans la virulence. Y. pestis héberge spécifiquement deux autres plasmides, pPst ou pCP1 (9,5 kb) et pFra ou pMT1 (96 kb).

Plusieurs aspects du pouvoir pathogène des *Yersinia* ont été très étudiés. Le premier concerne la colonisation bactérienne (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*) de la muqueuse intestinale, le second la survie des microorganismes dans les tissus infectés de l'hôte et enfin le troisième, la dissémination des *Yersinia* à partir du foyer infectieux initial. Ces trois volets seront passés en revue dans les pages qui suivent en précisant les facteurs bactériens impliqués.

#### I.2.A. La colonisation du tube digestif

#### I.2.A.1. La mobilité

Les flagelles semblent jouer un rôle décisif dans la colonisation du tube digestif par la plupart des bactéries entéropathogènes, en favorisant leur migration à travers le mucus qui recouvre la muqueuse intestinale [23, 24]. Comme de nombreuses autres espèces d'entérobactéries, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* produisent des flagelles distribués au pourtour cellulaire (flagelles péritriches).

Chez ces deux bactéries, plus d'une quarantaine de gènes qui sont répartis dans trois classes et dont l'expression est régulée en cascade, codent les protéines nécessaires à la structure, l'assemblage et au fonctionnement du flagelle [25-27]. La première classe comprend les gènes de régulation *flhD* et *flhC* qui contrôlent l'expression des gènes de la deuxième classe. Ces derniers codent les protéines formant le corps basal du crochet et le facteur sigma alternatif FliA nécessaire à l'initiation de la transcription des gènes de la troisième classe. Les gènes de la troisième classe sont impliqués non seulement dans la structure du filament mais aussi dans sa fonctionnalité (motilité et chimiotactisme) [28]. Chez *Y. pestis*, l'interruption du gène *flgF* (gène de classe 2) par une copie de la séquence d'insertion IS1541 et la présence d'un décalage du cadre ouvert de lecture dans les gènes *flhA* et *fliB* (gènes de classe 2) sont à l'origine de l'absence de production de flagelles, et par conséquent de l'immobilité de cette bactérie [26].

Chez Y. enterocolitica, les flagelles qui, rappelons-le, ne sont pas produits in vitro à  $37^{\circ}$ C, ne semblent pas jouer de rôle dans la virulence. En effet, sans flagelle, un mutant colonise le tube digestif de la souris aussi efficacement que la souche sauvage [27, 29]. Malgré ces résultats établis dans un modèle murin d'infection, les flagelles pourraient tout de même contribuer à la mise en place et/ou au développement de la colonisation bactérienne de la muqueuse digestive. En effet, chez Y. enterocolitica, le déplacement des bactéries grâce à leurs flagelles est requis pour initier l'invasion cellulaire in vitro [30]. La détection d'anticorps dirigés contre les flagelles dans le sérum de sujets ayant développé une infection intestinale par Y. enterocolitica indique que les flagelles sont bien exprimés lors du processus infectieux chez l'hôte, donc à  $37^{\circ}$ C [31].

Finalement, comme chez *Salmonella enterica* et *Vibrio cholerae*, c'est l'appareil de sécrétion nécessaire à la mise en place du flagelle qui participe à la pathogenèse, non pas en conférant la mobilité de la bactérie mais en permettant la sécrétion de facteurs de virulence [32-34].



Figure 4. Modèle de régulation des gènes *psa* de *Y. pseudotuberculosis* [40]. La taille et la topologie cellulaire des protéines sont hypothétiques.

ME, membrane externe ; MI, membrane interne ; P, périplasme.

#### I.2.A.2. Attachement aux cellules du tube digestif

#### Les pili Psa/Myf

Des fimbriae, favorisant l'adhérence des Yersinia à des cellules épithéliales, ont été visualisés lors d'une étude en microscopie électronique des bactéries [35, 36]. Chez Y. pestis et Y. pseudotuberculosis, ces pili ont été dénommés Psa (pH Six Antigen) car ils ne sont produits que lorsque les microorganismes poussent dans un milieu de culture dont le pH est légèrement acide et à 37°C [36-39]. Chez Y. enterocolitica, ces fimbriae, qui sont exprimés dans les mêmes conditions que les pili Psa, ont été appelés Myf (Mucoid Yersinia factor) en raison de l'aspect muqueux qu'ils confèrent aux colonies bactériennes [35]. Les gènes myf/psa sont présents uniquement chez les souches pathogènes du genre Yersinia [35]. Les gènes de biogenèse et de régulation de ces pili sont regroupés dans une même région du chromosome (locus *psa/myf*) et leur organisation génétique est conservée. Ils sont constitués de deux unités polycistroniques : psaABC/myfABC et psaEF/myfEF (Figure 4) [26, 35, 37, 39] [37, 39-41]. Le premier opéron coderait la protéine majeure du pilus (PsaA/MyfA), la chaperonne périplasmique (PsaB/MyfB) et la protéine de la membrane externe (PsaC/MyfC) ; le second, des protéines régulatrices (PsaE/MyfE et PsaF/MyfF). Un modèle de régulation, établi chez Y. pseudotuberculosis, propose que des modifications physico-chimiques du milieu (pH et température) induiraient un changement de conformation des protéines membranaires PsaE/MyfE et PsaF/MyfF nécessaires à la régulation du locus psaABC/myfABC (Figure 4) [40]. Chez Y. pestis, la production des pili Psa dépendrait également d'une régulation posttranscriptionnelle [38, 40].

A l'exception de Y. pestis, le rôle des pili Psa et Myf dans la virulence des autres Yersinia pathogènes pour l'homme n'est pas clairement établi. Ces fimbriae pourraient intervenir dans l'adhérence des bactéries aux entérocytes. En effet, des expériences d'adhérence *in vitro* ont montré que les pili Psa de Y. pseudotuberculosis permettent un attachement « thermo-induit »



**Figure 5.** Structure de la protéine YadA. (A). Structure hypothétique en bâtonnet de sucette du trimère YadA. Les trois polypeptides entrelacés sont représentés avec les différentes couleurs grises, les domaines structuraux et leur dimension sont indiquées. (B). Diagramme schématique de la protéine YadA (455 acides aminés) de *Y. enterocolitica* O:3. L'échelle à gauche indique la position des acides aminés. Les motifs NSVAIGXXS, les régions variables et hydrophobes, l'épitope linéaire antigénique sont indiqués par des petits rectangles. Les domaines structuraux de YadA sont indiqués à gauche, les fonctions et les propriétés de ces régions sont présentées à droite. D'après Tahir et Skurnik [51].

Tableau 1. Divergence des protéines YadA dans le genre Yersinia

Espèce/Souche ou sérotype	Taille de YadA (acide aminés)
Y. enterocolitica O:9	454
Y. enterocolitica O:3	455
Y. enterocolitica O:8	422
Y. pseudotuberculosis	434
Y. pestis	non produite

des microoganismes aux cellules épithéliales [39]. De plus, dans un modèle murin d'anse intestinale ligaturée, une localisation exclusive des mutants *psa* de *Y. pseudotuberculosis* sur l'épithélium des plaques de Peyer a été constatée. Ces données, ainsi que le fait que les gènes *psa* et *myf* s'expriment dans des conditions rencontrées par la bactérie lors de la traversée du duodénum (pH acide ; 37°C) laissent penser que ces fimbriae pourraient être nécessaires à la colonisation intestinale par les bactéries [37, 38, 39, 40, 41]. Ils pourraient contribuer, chez *Y. pestis*, à la formation du bubon et d'abcès dans différents viscères puisque les conditions d'expression de ces appendices sont réalisées dans ces lésions. L'augmentation, d'un facteur 100, de la DL50% (voie intra-veineuse) pour la souris d'un mutant *psa* de *Y. pestis* confirme le rôle des pili Psa dans la virulence bactérienne [37].

#### La protéine YadA, une adhésine « afimbriale »

Une autre voie d'attachement aux cellules intestinales met en jeu le produit du gène *yadA* [42]. Ce gène est porté par le plasmide de virulence pYV (Plasmid <u>Yersinia v</u>irulence) qui est présent chez les trois espèces de *Yersinia* pathogènes [43-45]. *In vitro*, il s'exprime à 37°C. Bien que transcrit, *yadA* produit une protéine tronquée chez *Y. pestis* par suite d'un décalage du cadre ouvert de lecture (insertion d'un résidu adénine (A) dans une séquence poly A [46]. D'un poids moléculaire variable selon la souche et l'espèce considérée (Tableau 1), YadA s'associe en un trimère de 200 à 240 kDa pour former une structure (en forme de sucette) exposée à la surface cellulaire [44, 47, 48, 49, 50] et comprend cinq domaines (Figure 5) [44, 47, 48, 49, 51]. Elle est impliquée dans la fixation de la bactérie au mucus intestinal [42] et dans ses interactions avec les cellules M *via* les intégrines  $\beta_1$  [52, 53]. Ce dernier aspect sera développé ultérieurement.

	Pré-domaine	Pro-domaine	Domaine mature
Y-STa	MKKIVFVLVLMLSSFGAFGQET	VSGQFSDALSTPITAEVYK	QACDPPSPPAEVSSDWD-CCDVCCNPACAGC
Y-STb	MKKIILALVLMLFSFCTLGQET	ASMHLDDTLSAPIAAEINF	RKACDTQTPSPSEEND-DWCCEVCCNPACAGC
Y-STc	MKKIVFVLTLMLFSFGTLGQET	ASGQVGDVSSSTIATEVSE	CASCGTQSATTQGENDWDWCCELCCNPACFGC

**Figure 6.** Alignement des séquences primaires des entérotoxines Y-ST déduites de la séquence nucléotidique des gènes *yst*. Les acides aminés identiques sont figurés en grisé. Les tirets ont été ajoutés pour optimiser l'alignement. Les résidus cystéine situés dans la région carboxy-terminale (flèches) contribuent à la stabilisation des toxines Y-ST.

#### I.2.A.3. La sécrétion d'entérotoxines

Attachées à la surface de l'épithélium intestinal, certaines bactéries entéropathogènes sécrètent des entérotoxines thermostables (STs) ou thermolabiles (LTs) [54, 55]. Ces toxines augmentent la concentration intracellulaire de GMPc ou AMPc en stimulant la guanylate-cyclase ou l'adénylate cyclase des entérocytes, ce qui conduit à une fuite d'eau et d'électrolytes des entérocytes vers la lumière intestinale [56].

Trois entérotoxines thermostables ont été identifiées chez Y. enterocolitica : Y-STa, Y-STb et Y-STc [57-61]. Elle sont codées par des gènes portés par le chromosome. A l'instar d'autres entérotoxines, Y-STa, Y-STb et Y-STc sont formées de trois domaines : un prédomaine correspondant au peptide signal, nécessaire au passage à travers la membrane interne ; un pro-domaine, dont le clivage permet au domaine mature (le troisième domaine) de la protéine de traverser la membrane externe (Figure 6) [62]. Contrairement à celui de Y-STa ou Y-STb, le pro-domaine de Y-STc n'est pas clivé [62]. Les protéines Y-ST sont caractérisées par une région carboxy-terminale très conservée, constituée de six résidus cystéine qui interviennent dans la formation de ponts disulfures : ils sont indispensables à la stabilité structurale des entérotoxines [62].

Bien que ces entérotoxines soient responsables d'une fuite d'eau et d'électrolytes, leur rôle dans la pathologie intestinale reste controversé. En effet, les premières études de régulation *in vitro* ont montré que le niveau de transcription du gène *yst* est plus élevé à 28°C qu'à 37°C [63]. Des investigations ultérieures ont révélé que le gène *yst* est en fait activé à 37°C lorsque les bactéries sont dans un environnement hyper-osmolaire (conditions analogues à celles réalisées dans l'iléon) [63]. De plus, un mutant *yst* de *Y. enterocolitica* ne provoque plus de diarrhées chez le lapereau infesté expérimentalement [57]. Finalement, la synthèse de l'entérotoxine durant la phase stationnaire de croissance des bactéries (situation probable dans laquelle se trouve *Y. enterocolitica* préalablement à l'infection de l'hôte) ainsi que la présence

du gène *yst* préférentiellement chez les souches pathogènes de l'espèce de *Y. enterocolitica* (biovar 1B) sont deux arguments renforcant l'hypothèse que l'entérotoxine Y-ST induirait une diarrhée au cours de l'infection intestinale par *Y. enterocolitica* [58, 60, 64].

Des gènes spécifiant des entérotoxines ont été identifiés chez les espèces Y. intermedia, Y. kristensenii et Y. bercovieri [58, 60, 61]. Y. pestis ne produirait pas d'entérotoxine. Toutefois, il convient de mentionner que la séquence d'insertion IS285 de Y. pestis présente une très forte identité (77%) avec le gène codant l'entérotoxine EAST1 des souches EHEC d'E. coli [55]. La protéine n'est pas produite par Y. pestis car la phase ouverte de lecture comporte trois codons stop. Finalement, l'absence du gène yst dans le génome de Y. pseudotuberculosis pourrait expliquer la fréquence moins élevée de diarrhées lors de l'infection digestive par cette espèce de Yersinia [58].

#### I.2.A.4. Les Protéines d'invasion cellulaire et traversée du tube digestif

Les Yersinia sont capables d'entrer, selon un processus apparenté à la phagocytose, dans des cellules épithéliales en culture. Trois gènes d'invasion, deux chromosomiques (*inv* et *ail*) et un plasmidique (*yadA*), ont été identifiés chez Y. enterocolitica et Y. pseudotuberculosis [65, 66] [52, 53]. Chez Y. pestis, le seul gène d'invasion cellulaire connu est *pla*, qui est porté également par un plasmide, mais différent de celui arborant *yadA* [67].

#### L'invasine

Le gène *inv* est présent chez toutes les espèces pathogènes du genre *Yersinia* [65; 66]. Le gène *inv* code une protéine dénommée invasine (de 92KDa chez *Y. pseudotuberculosis* et de 103KDa chez *Y. enterocolitica*), localisée dans la membrane externe bactérienne. Les souches de *Y. enterocolitica* dénuées de pouvoir pathogène (biotype non 1B) ne produisent pas d'invasine car le gène *inv* n'est pas transcrit [68, 69]. A l'inverse, *inv* de *Y. pestis* est transcrit



Figure 7. Structure de l'invasine de Y. pseudotuberculosis. L'invasine est constituée d'un module d'ancrage membranaire et d'un module d'adhérence cellulaire. Le second module est divisé en 5 domaines (D1à D5), D2 étant absent chez Y. enterocolitica. Les acides aminés déterminant pour la fixation de l'invasine à son récepteur cellulaire sont représentés en caractères italiques.

mais le gène ne produit pas une invasine entière car il est interrompu par une copie de la séquence d'insertion IS1541 [6]. Le récepteur cellulaire de l'invasine a été identifié. Il s'agit. là encore, d'intégrines de la famille  $\beta$ 1 ( $\beta$ 1 $\alpha$ 3,  $\beta$ 1 $\alpha$ 4,  $\beta$ 1 $\alpha$ 5 et  $\beta$ 1 $\alpha$ 6) [66, 70-77]. La région qui permet à l'invasine d'adhérer puis d'entrer dans la cellule épithéliale est située dans la région carboxy-terminale de la protéine. Cette région, constituée de cinq domaines (D1 à D5) chez Y. pseudotuberculosis et de quatre domaines chez Y. enterocolitica (D1, D3, D4 et D5). forme une structure proche de celle de la super famille des immunoglobulines [77]. Elle comprend les acides aminés indispensables à la reconnaissance de l'intégrine (Figure 7) : Asp-811, Asp-911, Cys-907 et Cys-982 qui, en formant un pont disulfure, créent une boucle dans la région C-terminale de la protéine (Figure 7) [72, 76]. Dans cette partie carboxy-terminale est localisé également le domaine D2 responsable de la dimérisation de l'invasine [77]. Cette dimérisation est nécessaire pour l'invasion cellulaire lorsque la concentration de l'invasine est faible [76, 77]. Il convient de noter que ce domaine est absent dans l'invasine de Y. enterocolitica, ce qui pourrait expliquer la plus forte transcription du gène inv chez cette espèce que chez Y. pseudotuberculosis [77]. Une synthèse plus importante d'invasine compenserait alors la baisse du pouvoir invasif consécutif à l'absence de dimérisation de la molécule.

Bien que l'invasine participe à l'entrée de *Yersinia* dans les cellules en culture, qu'elle soit produite par la bactérie *in vitro* dans des conditions similaires à celles observées dans l'iléon (37°C, pH 5.5, forte concentration saline) et également *in vivo* (notamment dans les plaques de Peyer), la dose létale d'un mutant *inv* pour la souris infectée *per os* n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage [78-80]. Néanmoins, la mutation du gène *inv* conduit à un retard de colonisation bactérienne des plaques de Peyer, mais pas des tissus profonds [81]. Ces observations montrent que l'invasine n'est pas requise pour l'établissement d'une infection, au moins chez la souris.

#### La protéine Ail

Le gène chromosomique ail est présent chez toutes les espèces pathogènes de Yersinia [65, 68, 82, 83]. Toutefois, chez Y. pestis, ail est interrompu par une copie de la séquence d'insertion IS285 (S. D. Torosian and R. M. Zsigray, Abstr. 96th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1996, abstr. B-213, 1996). Ail permet à Y. enterocolitica, mais pas à Y. pseudotuberculosis, d'entrer dans les cellules épithéliales en culture [65, 84]. Les divergences des séquences d'acides aminés des protéines Ail de ces deux bactéries expliqueraient cette différence d'activité biologique [83]. Plusieurs arguments plaidaient en faveur du rôle de ail dans la virulence : (1) sa transcription in vitro est plus active à 37°C qu'à 28°C [85], (2) son expression in vivo [78, 84] et (3) sa présence exclusivement chez les espèces pathogènes du genre Yersinia [68]. Cependant, l'étude d'un mutant ail de Y. enterocolitica dans un modèle murin d'infection orale a montré que d'une part, sa DL50% et d'autre part, sa capacité à coloniser les plaques de Peyer, le foie et la rate ne se différenciaient pas de celles de la souche sauvage [78, 84]. Dans l'éventualité où Ail serait impliquée dans le pouvoir pathogène de la bactérie, elle interviendrait après l'étape de colonisation et d'invasion de la muqueuse intestinale. En effet, ail n'est pas exprimé en anaérobiose, une des caractéristiques de l'environnement intestinal [86]. Enfin, il convient de mentionner que Ail confère un pouvoir invasif in vitro variable selon la lignée cellulaire employée; la protéine pourrait ainsi permettre la colonisation élective de certains tissus lors du processus infectieux [65].

#### La protéine YadA

Le gène plasmidique yadA code un produit permettant aux bactéries (exclusivement Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica) non seulement d'adhérer aux cellules eucaryotes (cf. ci dessus) mais aussi de les envahir [45, 52, 53]. L'invasion cellulaire fait suite à l'interaction de YadA avec les intégrines de la famille  $\beta$ 1 (au moins  $\beta$ 1 $\alpha$ 5) exprimées à la surface des cellules eucaryotes [52, 53]. L'inactivation de YadA de Y. pseudotuberculosis ne modifie pas la DL50% de la bactérie ni sa capacité à coloniser les tissus de l'hôte (Bölin, 1983). En revanche, l'absence de cette protéine chez Y. enterocolitica rend la bactérie beaucoup moins virulente [78, 81, 87]. Ainsi, le rôle de YadA apparaît différent chez les deux espèces. Chez Y. pseudotuberculosis, YadA, grâce à sa propriété de liaison au mucus, favoriserait la concentration des bactéries au voisinage des plaques de Peyer. Marra et Isberg ont montré que la mutation de yadA chez une souche de Y. pseudotuberculosis déjà mutée dans le gène inv (double mutant inv yadA) permet à la bactérie de recouvrer sa capacité à migrer dans les plaques de Peyer [88]. Après multiplication à la surface épithéliale, les microorganismes interagiraient, via l'invasine, avec les intégrines  $\beta$ 1 exprimées par les cellules M. Une fois fixée, la bactérie subit une translocation rapide dans les plaques de Peyer selon un processus apparenté à la phagocytose [88]. Chez Y. enterocolitica, la perte de virulence n'est pas due à l'incapacité de la bactérie à traverser la barrière intestinale [78, 81, 87]. YadA pourrait, là encore, favoriser la concentration localisée de Y. enterocolitica, mais son rôle principal semble plutôt de permettre la survie dans les plaques de Peyer [78, 81, 87].

#### La protéine Pla

La DL50% de Y. pestis pour la souris infestée par voie gastrique est 100 fois inférieure à celle de Y. pseudotuberculosis [89]. Cette donnée expérimentale est surprenante puisque Y. pestis ne produit pas d'invasine ni YadA. Elle pourrait être expliquée d'une part, par le très haut pouvoir pathogène de Y. pestis et, d'autre part, par l'existence de facteur(s) d'adhérence/invasion cellulaire spécifique(s) de l'agent de la peste [67, 90].

La découverte que la capacité de Y. pestis à adhérer à certains composés de la matrice extracellulaire (laminine et protéoglycane à héparan sulfate) dépend du produit du gène pla [91], a conduit la mise au point d'un nouveau protocole expérimental d'invasion cellulaire qui

a démontré le rôle de *pla* dans l'entrée de *Y. pestis* dans des cellules épithéliales en culture [67]. Ce gène, porté par le plasmide pPst (9.5 kb) spécifique de *Y. pestis*, code la protéine de surface Pla constituée de 292 acides aminés (34,6 kDa) [92].

#### I.2.B. La survie dans les tissus

Entrées dans le système réticulo-endothélial, les bactéries doivent échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Cette capacité est multi-factorielle et met en jeu tout particulièrement le plasmide de virulence pYV qui est, rappelons le, essentiel à la virulence de *Yersinia* [93].

#### I.2.B.1. La résistance à la phagocytose

Les trois espèces de Yersinia doivent échapper à l'action des polynucléaires neutrophiles et des macrophages pour établir une infection tissulaire [94]. La résistance à la phagocytose nécessite le virulon Yop (Yersinia outer protein) codé par le plasmide pYV. Ce virulon est responsable d'une injection polarisée de protéines effectrices depuis le cytoplasme de la bactérie jusque dans celui du phagocyte. Les protéines effectrices Yop injectées interfèrent alors avec les voies de signalisations cellulaires de la cellule hôte [95]. Ce virulon est également dénommé LCR (pour Low-Ca<sup>2+</sup> Response) car il assure la sécrétion des protéines dans le milieu extérieur lorsque l'environnement de la bactérie est privé de calcium [95].

#### La génétique du virulon Yop

L'inhibition de croissance des bactéries à la fois à  $37^{\circ}$ C et en absence d'ion Ca<sup>2+</sup> est associée à une sécrétion massive des Yop [96, 97]. A partir de cette observation, des études génétiques ont été entreprises pour élucider le phénomène. Par mutagenèse d'une souche sauvage, ont été obtenus des mutants incapables de sécréter les Yop, pouvant se multiplier à  $37^{\circ}$ C et en absence de calcium (mutants dits « calcium-indépendants »). Au cours de ces expériences, ont été aussi générés des mutants capables de sécréter les Yop indépendamment de la concentration du milieu en ion Ca<sup>2+</sup> et à  $37^{\circ}$ C, ils sont incapables de croître à  $37^{\circ}$ C en absence de calcium (mutants dits « thermo-sensibles »). La caractérisation de ces deux types de mutants a conduit à l'identification d'un ensemble de gènes impliqués dans la formation d'un appareillage de sécrétion de type III [98] [99]. Certains de ces gènes n'ont malheureusement pas la même dénomination chez *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* malgré qu'ils soient très similaires [100] et, l'organisation génétique du virulon Yop est également variable selon l'espèce considérée [101, 102]. Les gènes constituant ce virulon peuvent être regroupés dans trois catégories : ceux qui codent les protéines effectrices Yop [95, 103]; ceux qui spécifient l'appareil de sécrétion et les protéines chaperons nécessaires au passage des protéines effectrices à travers les membranes de la bactérie [104, 105]; enfin, ceux qui gouvernent la production des protéines de translocation permettant le passage des protéines effectrices à travers la membrane des cellules eucaryotes.

#### L'appareil de sécrétion

La machinerie de sécrétion, dénommée Ysc (Yop secretion), est codée par plus de 20 gènes répartis en quatre loci : *virC* (*yscABCDEFGHIJKLM*), *virG* (*yscW*), *virB* (*yscNOPQRSTU*), *virA* (*yscV* [ex *lcrD*], *yscX*, *yscY sycN*, *tyeA*, , *lcrR* et *yopN*) [104, 106]. YscD, YscR, YscU, et YscV, aidées très probablement par les protéines YscS et YscT, forment un pore dans la membrane interne [95]. YscC s'insère dans la membrane externe grâce au concours de la protéine auxiliaire YscW (VirG) et constitue, après polymérisation, un pore [107]. Les pores externe et interne seraient reliés par YscJ [95]. La protéine YscN hydrolyse l'ATP et fournirait ainsi l'énergie nécessaire à la sécrétion [108]. La fonction des protéines YscP, YscP, YscP, YscP, YscP, YscP, YscK reste indéterminée. Exposée à la surface bactérienne, YscP



Figure 8. L'appareil de sécrétion de type III de Yersinia.

ME, membrane externe ; MI, membrane interne

est cependant une protéine majoritairement cytoplasmique dont le rôle dans la sécrétion des Yop nécessite YscO [109, 110]. YscO et YscX sont présentes dans le cytoplasme et sont sécrétées [111, 112]. Les quatre protéines YscQ, YscL et YscK forment un tétramère, YscQ interagissant avec YscK et YscL, et YscL avec YscN [113]. Les protéines YscY, YscG s'associent avec YscX et YscE, respectivement [112, 114] et ces protéines seraient des chaperons [112, 114]. Le pore est bloqué d'une part au pôle apical par YopN (LcrE) [115] et TyeA (<u>T</u>ranslocation of <u>Y</u>op into <u>e</u>ukaryotic cells <u>A</u>) [116] et, d'autre part, au pôle basal par la protéine LcrG (Figure 8) [98].

#### L'appareil de translocation

L'appareil de translocation réalise un pore dans la membrane de la cellule cible et permet ainsi d'injecter les effecteurs Yop (voir ci-après) dans le cytosol de celle-ci. Il met en jeu les produits des gènes *yopB*, *yopD*, *lcrV*, *yscF*. YopB et YopD seraient les éléments constitutifs du pore (Figure 9) [117, 118]. Il convient de mentionner que ce pore ne peut pas se former dans la membrane bactérienne car YopB est séquestrée par la protéine chaperon SycD [118]. LcrV est située dans le cytoplasme ainsi qu'à la surface de la bactérie [98] et interagit avec les protéines YopB et YopD [119] ; son rôle exact est encore inconnu. Enfin, YscF forme après polymérisation une sorte « d'aiguille » à la surface de la bactérie qui perfore la membrane plasmique de la cellule eucaryote [120]. Le modèle de la translocation impliquant LcrV, YopB et YopD reste controversé. En effet, les travaux réalisés par Neyt et Cornelis laissaient penser que YopB et YopD étaient sécrétées sous une forme associée et que le pore résultait de la polymérisation du complexe YopB-YopD [117]. Les travaux de Hakansson et co-auteurs ont montré que YopB semble être suffisante à elle seule pour constituer le pore [121]. Enfin, YopD, qui est détectée dans le cytosol des cellules eucaryotes, serait un constituant transitoire du pore et aurait la fonction de chaperon « extracellulaire », permettant la translocation des effecteurs Yop *via* YopB [117].

#### Les protéines chaperons

La plupart des protéines sécrétées requièrent la présence de protéines cytoplasmiques dénommées Syc (Specific Yersinia chaperon) ayant la fonction de chaperon (Figure 9). Elles protégent les protéines qu'elles fixent en empêchant des associations prématurées et en évitant leur dégradation [122]. Les gènes *syc* sont généralement localisés à proximité des gènes spécifiant les protéines fixées aux chaperons. Les protéines Syc peuvent être arbitrairement divisées en deux familles. L'une inclut les protéines SycE, SycH, SycN et SycT qui interagissent respectivement avec les protéines YopE, YopH, YopN et YopT. L'autre famille comprend un seul représentant, SycD, qui s'associe avec YopB et YopD (Figure 9). Ces protéines chaperons permettraient de délivrer les effecteurs Yop dans la cellule cible de manière hiérarchique. En effet, la sécrétion de YopE est possible en l'absence de SycE mais uniquement si les autres effecteurs Yop ne sont pas exprimés [123].

#### Les protéines effectrices

L'association d'un ligand avec des intégrines active la protéine kinase C (PKC), la protéine tyrosine kinase Src et la protéine FAK (<u>Focal adhesion kinase</u>). Les protéines FAK et Src, en coopération, phosphorylent la protéine Cas (Cas-pY). Cette phosphorylation aboutit au recrutement de facteurs échangeant des résidus de nucléotides « guanilylés» ou GEFs (*guanine exchange factors*). PKC recrute également ces facteurs mais selon un processus encore inconnu. Les GEFs activent les GTPases de la famille Rho (Rho, Rac, Cdc42) en remplacant le GDP fixé aux enzymes par le GTP. Rac et Cdc42 sont requises respectivement pour la formation de lamellipodes et de filopodes. Rho, qui est nécessaire pour l'étalement





ME, membrane externe ; MI, membrane interne ; MC, membrane cytoplamsique ; C, cytoplasme ; P, périplasme.

cellulaire, participe au regroupement des intégrines et induit l'activation de protéines d'adhérence focale (FC, focal contact) comme p130<sup>cas</sup>, Fak, Fyn et paxilline ainsi que la formation des fibres de stress.

Six protéines effectrices, YopM, YopE, YopH, YopT, YpkA et YopP, sont injectées dans le cytoplasme de la cellule hôte et interfèrent dans la signalisation cellulaire décrite précédemment (Figure 9). Elles sont à l'origine du dysfonctionnement de la cellule immunitaire, voire de sa mort. Aujourd'hui, seul le rôle de YopM demeure indéterminé. YopE, YopH, YopT et YpkA (encore appelé YopO) sont toutes impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine. YopE est une cytotoxine appartenant à la famille GAP (<u>GTPase activating protein</u>). Elle inhibe les protéines Rac, Cdc42 et Rho en accélérant l'hydrolyse du GTP en GDP [124, 125]. YopH est une phosphotyrosine phosphatase [126] déphosphorylant la protéine p130<sup>cus</sup>; elle perturbe aussi l'activation des autres protéines FC et des fibres de stress selon un processus inconnu [103]. YopT, la seconde cytotoxine agit sur RhoA. Elle augmente l'interaction de RhoA avec une protéine empêchant l'échange du GDP en GTP [127]. YpkA (YopO) est une sérine-thréonine kinase [128] qui interagit avec Rho et Rac. YopJ (encore appelée YopP) inhibe la protéine IKKβ, une kinase qui phosphoryle IκB ; ce dernier est l'inhibiteur du facteur de transcription nucléaire NF-κB [129]. Dans cette condition, NF-κB ne migre pas dans le noyau. YopJ induirait l'apoptose par ce mécanisme.

#### La régulation du système

#### L'étape transcriptionnelle

Le changement de température joue un rôle crucial dans la mise en place de l'appareil de sécrétion. A 37°C, VirF (ou LcrF) active *virC*, *yopH*, *yopE* et *lcrG* [130]. La production de VirF est elle-même contrôlée à une étape post-transcriptionnelle [131] : à 28°C, la séquence de Shine-Dalgarno en amont de *virF* est séquestrée dans une structure secondaire de

l'ARNm ; à 37°C, cette structure est déstabilisée et l'ARNm peut alors être traduit [131]. Les modifications topologiques du plasmide pYV (courbure de l'ADN) induites à 37°C pourraient aussi participer au contrôle de la régulation de l'expression des gènes constitutifs de l'appareil de sécrétion de type III et d'une manière générale, de tous les gènes plasmidiques [132].

La régulation fait également intervenir les répresseurs transcriptionnels LcrQ (ou YscM) et SycH [133, 134]. Dans des conditions *in vitro* où la sécrétion n'est pas induite, LcrQ qui est présent en grande quantité dans le cytoplasme bactérien, réprime les gènes formant l'appareil de sécrétion de type III. La protéine SycH interagirait avec LcrQ et participerait à la sécrétion de cette protéine lors d'une induction du système de sécrétion : la répression génique serait alors abolie [133].

#### L'etape post-transcriptionnelle

La sécrétion des protéines est régulée par deux signaux de sécrétion. La région minimale requise pour la sécrétion des Yop est comprise dans les 20 premiers résidus des protéines YopN, YopE, YopH et YopQ [135-137]. Ce signal de sécrétion n'est pas compris dans la séquence protéique. En effet, aucun motif consensus n'a pu être déterminé après alignement des séquences de ces quatre protéines. Par ailleurs, des mutations ou des changements du cadre ouvert de lecture ne bloquent pas la sécrétion de la protéine modifiée. Ainsi, le signal de sécrétion serait présent dans la région 5' de l'ARNm qui constituerait une structure secondaire incluant le codon d'initiation de la traduction [135, 136]. Cette conformation de l'ARNm permettrait la fixation d'une protéine inhibant la traduction. Dans des conditions d'induction (37°C, absence de Ca<sup>2+</sup>), le facteur protéique se dissocierait de l'ARNm permettant ainsi la fixation des ribosomes sur l'acide nucléique. L'ARNm libéré, s'associerait à l'appareil de sécrétion et ensuite, sa traduction débuterait [135, 136]. Toutefois, ce modèle ne s'applique qu'à YopQ.
Un autre signal de sécrétion est utilisé par YopE, YopH et potentiellement YopN et YopT. Il est localisé entre le 15<sup>ème</sup> et 100<sup>ème</sup> acide aminé de ces protéines. C'est sur cette région que se fixe la protéine chaperon correspondante (SycE pour YopE, SycH our YopH, SycN pour YopN et et SycT pour YopT) [138-140], ce qui assurerait une conformation correcte et stable de l'effecteur. Le complexe protéique serait alors dirigé vers l'appareil de sécrétion pour permettre la translocation de l'effecteur dans la cellule cible [141]

## Le modèle de la sécrétion

Les études portant sur le phénotype des différents mutants *ysc*, *yop*, *syc*, sur les interactions protéine-protéine, et sur les localisations cellulaires des protéines Ysc, Yop et Syc, ont conduit au modèle suivant : les canaux de sécrétion Ysc restent bloqués en absence de  $Ca^{2+}$  ou de contact cellulaire. Les portes bloquant la sécrétion nécessiterait les protéines YopN (dénommées aussi LcrE) [115] et TyeA [116] au niveau de la membrane externe et, la protéine LcrG [142] au niveau de la membrane interne (Figure 8). Ce blocage est renforcé par la rétention des protéines LcrQ [143] et YopD [144]. Dans des conditions levant ce blocage, la protéine LcrQ est purgée de la bactérie, ce qui conduit à l'expression et à la sécrétion des Yop et de la protéine LcrV.

Les Yop ne contiennent pas de séquence signal et ne sont pas clivées lors de leur passage à travers l'appareil de sécrétion Ysc. Les travaux de Anderson et Schneewind démontrent que la sécrétion des protéines YopE, YopH, YopN (LcrE) [136] et YopQ [135] dépend d'un signal de sécrétion contenu dans les ARNm codant ces protéines. Un autre mécanisme de régulation de sécrétion nécessite les protéines chaperons Syc [145]. Ces protéines fonctionneraient comme donatrices des protéines Yop à la machinerie de sécrétion [122].

Lors du contact bactérie-cellule eucaryote, six protéines sont relarguées dans le cytoplasme du phagocyte où elles jouent le rôle d'effecteur. Le ciblage de ces effecteurs à travers la membrane plasmique de la cellule eucaryote est accompli par les protéines YopB, YopD, LcrV, YscF. Le rôle de YopD et LcrV n'est pas encore très clair. YopD interagit avec YopB [118] et LcrV semble être requis pour placer YopB dans la membrane de la cellule eucaryote et la formation du pore. LcrV participerait à la mise en place de l'appareil de translocation des Yops constituant un tunnel joignant la cellule hôte et le canal Ysc [98].

# I.2.B.2. L'inhibition de la réponse inflammatoire de l'hôte

Les *Yersinia* éviteraient le système immunitaire en empêchant la réponse inflammatoire de l'hôte *via* YopJ (YopP) et LcrV. YopJ inhibe la production du *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF $\alpha$ ) par les macrophages et la production de l'interleukine 8 (IL-8) par les cellules endothéliales [95, 146, 147] en bloquant l'activation à la fois du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B et des *Mitogen-Activating Protein Kinase* (MAPK) [146, 147]. La protéine LcrV participerait également à l'inhibition de la production de TNF $\alpha$  et d'interféron gamma (INF $\gamma$ ) mais le mécanisme d'action est encore mystérieux [148].

Par ailleurs, *Yersinia* réduirait le recrutement des cellules du système immunitaire : LrcV, comme YadA, inhiberait l'attraction des polynucléaires neutrophiles au site d'infection [149]. Plus particulièrement, en clivant le composé C3, YadA empêche la formation de l'anaphylatoxine C5a. YopJ diminuerait le recrutement des neutrophiles dans les foyers infectieux en réduisant la présentation des molécules d'adhérence ICAM-1 et E-sélectine à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire [95].

## I.2.B.3. La résistance au complément

Le complément est un système protéique impliqué dans les défenses de l'organisme contre les cellules étrangères. Il est constitué d'une vingtaine de protéines dont treize participent à



Figure 10. La protéine membranaire YadA confère à *Yersinia* la capacité de résister à l'action du complément (« séro-résistance »). A gauche est représentée schématiquement une partie de la cascade d'activation du complément et à droite, le mécanisme de résistance de la bactérie à l'action du complément.

une cascade réactionnelle tandis que les autres ne font que contrôler l'activation de l'ensemble du système. L'activation du complément a trois conséquences : un effet opsonisant, qui résulte de la fixation du composé C3b à la surface de la bactérie ; un effet lytique, dû à la formation du complexe d'attaque membranaire ; un effet inflammatoire, secondaire à la libération de polypeptides.

L'opsonisation facilite l'ingestion des bactéries par les polynucléaires neutrophiles qui présentent à leur surface les récepteurs cellulaires CR1 ou CR3 reconnaissant les composés C3b ou C3bi déposés à la surface de la bactérie cible. Chez les *Yersinia* pathogènes, les protéines Ail, YadA, le lipopolysachharide (LPS) et la capsule perturbent l'action du complément [85, 150-152].

# La protéine YadA, LPS et Ail

L'augmentation de la résistance bactérienne au complément dépend de la présence du plasmide de virulence (pYV) uniquement chez *Y. enterocolitica* [153]. Les travaux pionniers de Balligand et co-auteurs [154] et China et co-auteurs [152] ont démontré que chez cette espèce, cette propriété dépend de la protéine YadA mais pas des Yops. En mesurant la quantité des différents composés du complément déposés sur les bactéries, Pilz et co-auteurs ont démontré que YadA élève la proportion de composé C3b inactivé (C3bi), diminuant ainsi la proportion de composé C3b sur la membrane bactérienne ; il en résulte un empêchement de la formation du complexe d'attaque membranaire (Figure 10) [150]. La diminution de la fixation du composé C3b est la conséquence de l'association de YadA au facteur H, l'un des régulateurs de l'activation du complément. Elle conduit à un changement de conformation du composé C3b qui devient alors sensible au facteur protéolytique I : la cascade d'activation du complément est donc bloquée [152].

en la face avante de la programa avante de

Le LPS contribue également à la résistance au complément de Y. pestis, Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica. En effet, une souche sauvage donnant des colonies de type lisse (smooth ou S) est plus résistante qu'un mutant isogénique donnant des colonies de type rugueux (rough ou R) [150]. A ce jour, aucun mécanisme moléculaire n'a été proposé pour expliquer ce phénomène.

Enfin, il a été démontré que chez *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*, la protéine Ail intervient dans la résistance à l'action du complément [39, 155]. Chez *Y. pestis, ail* est inactif par suite de l'interruption du gène par une copie de la séquence d'insertion IS285 (S. D. Torosian and R. M. Zsigray, Abstr. 96<sup>th</sup> Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1996, abstr. B-213, 1996). Le mécanisme de résistance bactérienne au complément conféré par cette protéine reste inconnu. Toutefois, il a été établi par mutagenèse dirigée que les boucles 2 et de 3 de cette protéine de surface sont nécessaires à l'activité biologique de Ail [83].

# La capsule

Seule Y. pestis synthétise une capsule. Cette structure protége la bactérie contre le complément en formant un véritable bouclier autour de la cellule [156]. De nature glycoprotéique, la capsule est codée par l'opéron *caf (caf1M, caf1A* et *caf1*) situé sur le plasmide de 101 kb dénommé pFra (pour *Fraction antigen I*) [157]. Les gènes *caf1M, caf1A* et *caf1* codent respectivement la protéine chaperon périplasmique Caf1M [158], la protéine de la membrane externe Caf1A et la sous-unité structurale de la capsule, Caf1 [159]. Caf1M est essentielle pour l'exportation et l'assemblage des sous-unités structurales Caf1 à la surface de la bactérie. Caf1M a notamment pour rôle, d'une part de protéger la sous-unité Caf1 de la dégradation en facilitant son repliement à la face externe de la membrane cytoplasmique [157] et, d'autre part d'empêcher l'agrégation des sous-unités structurales Caf1 [160].

Bien qu'il soit très rare d'isoler des souches de Y. pestis sans capsule, le rôle de cette structure dans la virulence bactérienne a été remis en question à la lumière d'expérimentations animales [161]. En effet, en dépit de la perte de la capsule, la DL50% de Y. pestis pour la souris reste inchangée. Cependant, il convient de mentionner qu'une souche sauvage (capsulée) persiste plus longtemps chez l'animal qu'un mutant isogénique sans capsule (respectivement, 10 jours contre 5 jours) [161].

# I.2.C. La dissémination tissulaire

# I.2.C.1. Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire

## La protéine Pla

Outre son implication dans l'invasion cellulaire, la protéine Pla dégrade *in vitro* le composé C3 du complément [162], le plasminogène [162] et l'inhibiteur de la plasmine [91]. Cette sérine protéase joue un rôle capital dans la dissémination hématogène de *Y. pestis* à partir du bubon. Expérimentalement, il a été démontré que la DL50% par voie sous-cutanée de *Y. pestis* est 1.000.000 de fois plus élevée lorsque la bactérie n'exprime plus *pla*. En revanche, un mutant *pla* est aussi virulent par voie intraveineuse qu'une souche sauvage (DL50% < 10 bactéries) [162]. Pla serait responsable d'une protéolyse tissulaire incontrôlée par activation à la fois du plasminogène en plasmine et par l'inactivation de  $\alpha$ 2AP, l'inhibiteur de la plasmine [163]. La dégradation de la fibrine par la plasmine pourrait également contribuer à la diffusion bactérienne dans les tissus en limitant le dépôt de fibrine au site initial d'infection [162]. Finalement, la présence d'un faible recrutement de leucocytes polynucléés au lieu d'inoculation de *Y. pestis* serait la conséquence d'une inhibition, par la protéine Pla, de la formation de composés « chimio-attractifs » produits lors de l'activation du complément [162]. Bien qu'elle interfère avec le composant C3b du complément, la protéine

Pla ne semble néanmoins pas être un facteur majeur de résistance bactérienne au complément puisqu'une souche de *Y. pestis* dépourvue du plasmide pPst ou dont le gène *pla* a été muté est toujours résistante à l'action du sérum humain [162].

Il est intéressant de noter plusieurs similitudes entre la protéine Pla et YadA : (1) ces deux protéines permettent l'adhérence des bactéries à la membrane basale des épithélia et à la matrice extracellulaire ; (2) leur inactivation conduit à la perte de la dissémination microbienne et donc à une diminution de la virulence. Ainsi, il est tentant de spéculer que, chez *Y. pestis*, la perte de la fonctionnalité du gène *yadA* aurait été compensée par l'acquisition du gène *pla* porté par le plasmide pPst.

# La phospholipase YlpA

La recherche, à partir d'une banque génomique, des gènes de Y. enterocolitica conférant une activité lécithinase à E. coli a conduit à l'identification du gène ylpA [164]. Aucun gène homologue n'a été trouvé chez les autres espèces pathogènes de Yersinia par une analyse génomique in silico. Le gène ylpA, qui appartient au régulon flagellaire, s'exprime au début de la phase de croissance bactérienne et de façon optimale à pH 7 [34]. Il code la phospholipase A [164] qui est sécrétée par l'appareil d'exportation flagellaire [165].

La mutation du gène ylpA est associée à l'incapacité de Y. enterocolitica à coloniser les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques de la souris infectée per os [164]. A ce jour, la fonction exacte de cette protéine dans la virulence bactérienne reste inconnue. A l'instar d'autres phospholipases A bactériennes, YlpA lyse les globules rouges, l'hémolyse étant considérée comme consécutive à la déstabilisation de la membrane plasmique érythrocytaire [166]. Ainsi, la protéine YlpA de Y. enterocolitica pourrait promouvoir la dissémination tissulaire des bactéries en détruisant les membranes cellulaires, dont celles des phagocytes. Toutefois, cette protéine pourrait plus simplement participer à la multiplication bactérienne en

fournissant les molécules nécessaires au métabolisme. Encore une fois, il est intéressant de constater que *Y. pestis* a pallié son inaptitude à produire YlpA et YadA par l'acquisition du plasmide de dissémination tissulaire pPst (ou pPla).

# I.2.C.2. L'acquisition du fer

Chez l'hôte, la concentration en fer libre étant trop faible pour subvenir aux besoins des bactéries, celles-ci ont développé différentes stratégies pour acquérir cet élément qui est séquestré dans des ferri-protéines (lactoferrine, transferrine, haptoglobine.....) de l'hôte. Communément, les bactéries synthétisent des sidérophores qui sont des petites molécules (masse moléculaire voisine de 500 Da) dont l'affinité pour le fer est très supérieure à celles des ferri-protéines. Concomitamment, les bactéries produisent à leur surface un récepteur spécifique du sidérophore synthétisé. D'autres bactéries peuvent capter directement la transferrine, la lactoferrine et/ou des composés hémiques *via* des récepteurs spécifiques membranaires. Chez *Yersinia*, parmi les six systèmes d'acquisition du fer, Ybt, Yfe, Hms, Yfu, Hme et Hmu, seuls les trois premiers sont requis pour que la bactérie puisse se multiplier chez l'hôte.

## Le système de capture Ybt

Ce système d'acquisition du fer, qui met en jeu un sidérophore, la yersiniabactine (Ybt) [167, 168] est codé par des gènes localisés sur un îlot de haute pathogénicité (HPI) présent chez Y. pestis, Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica [169, 170]. Dans ces trois espèces, les gènes ybt homologues sont identiques à plus de 97% [169, 171, 172] mais, en dépit de ces similitudes, ils sont malheureusement désignés différemment. Les gènes constitutifs du système Ybt sont organisés en quatre loci dont deux forment un opéron de 5 et 4 gènes : 1) psn, 2) irp2-irp1-ybtU-ybtT-ybtE, 3) ybtA, 4) ybtP-ybtQ-ybtX-ybtS [169, 171-175]. La

différence majeure entre Y. pestis et Y. enterocolitica est la présence d'une séquence nucléotidique (125 résidus) répétée dans la région promotrice de ybtA de Y. enterocolitica [169]. Le gène ybtA code un régulateur transcriptionnel activant les gènes ybt et réprimant sa propre expression. L'expression de tous les gènes ybt est inhibée par la protéine régulatrice Fur et activée par le sidérophore lui-même [173, 176-180].

La biogenèse de la yersiniabactine requiert les protéines HMWP1 et HMWP2 (codées respectivement par les gènes *irp1* et *irp2*), YbtE, YbtS et probablement YbtT [167, 181-183]. Une fois la yersiniabactine complexée au fer (Fe<sup>3+</sup>), le ferri-sidérophore est incorporé dans la bactérie grâce au concours d'une protéine de la membrane externe, Psn (le récepteur de la yersiniabactine) et des protéines de la membrane interne, YbtP et YbtQ, l'ensemble formant un transporteur de type ABC [174, 184]. Après entrée du complexe dans le cytoplasme, le fer est libéré. Un modèle de régulation propose que la formation du complexe Ybt-YbtA activerait les gènes *ybt* et réprimerait le gène *ybtA*.

La mutation du gène ybtX n'influence ni la synthèse de la yersiniabactine, ni l'acquisition du fer par la bactérie. En revanche, celle des gènes ybtT et ybtU abolit la production du sidérophore [167, 173]. La protéine YbtU, qui est probablement située dans la membrane interne bactérienne, régule négativement les gènes ybt [167]; son rôle exact est encore inconnu. La présence, chez YbtT, d'un motif peptidique caractéristique des thioestérases suggère que cette protéine participerait à la formation de la yersiniabactine [167].

## Le transporteur Yfe

La complémentation d'une souche d'*E. coli* incapable d'incorporer du fer par des fragments d'ADN génomique de *Y. pestis*, a permis d'identifier le système de transport Yfe [185]. Ce transporteur est également présent chez *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Il permet non seulement d'incorporer du fer mais aussi du manganèse. Ce système est codé par

cinq gènes organisés en deux loci distincts, de polarité opposée, et qui sont séparés par une phase ouverte de lecture putative [185]. Le premier locus inclut l'opéron *yfeABCD* qui est régulé par le fer, le manganèse et Fur. Cet opéron spécifie la protéine périplasmique YfeA, l'ATPase YfeB et les deux protéines membranaires YfeC et YfeD. Le second locus comprend uniquement le gène *yfeE* codant une protéine membranaire dont le rôle est indéterminé [185].

Les deux systèmes d'incorporation du fer Ybt et Yfe ont une importance variable dans le pouvoir pathogène bactérien. Les mutants de *Y. pestis* dépourvus du système de transport Ybt ne sont plus virulents par voie sous-cutanée alors qu'ils restent pleinement virulents par voie intraveineuse [181]. Ainsi, le système Ybt semble intervenir au tout début du processus infectieux induit par *Y. pestis*. Cela ne semble pas être le cas du système Yfe qui jouerait un rôle à un stade plus tardif de l'infection comme l'indique l'observation d'une perte complète de la virulence du double mutant Ybt Yfe par voie intraveineuse [186].

# Le système Hms

Le système Hms (<u>haemin storage</u>) est présent chez Y. pestis. Il dépend de l'opéron hmsHFRS codant les protéines HmsH et HmsF, qui sont localisées dans la membrane externe, et les protéines HmsR et HmsS dont la situation cellulaire reste imprécise [187-189]. L'expression de cet opéron est réprimée par la protéine Fur [180]. Le système Hms est un complexe protéique accumulant du fer ferrique et de l'hémine à la surface de la bactérie. Malgré cette accumulation, d'après des expériences *in vitro*, le fer n'est pas utilisé par la bactérie pour sa croissance [190] mais pour résister à l'action des composés oxygénés bactéricides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO) produits par l'hôte [190]. Néanmoins, le système Hms ne contribue pas à la virulence de la bactérie pour la souris [190]. Contre toute attente, il a même été constaté que la souche sauvage (Hms<sup>+</sup>) est légèrement moins virulente par voie souscutanée, qu'un mutant *hms* [190]. Cette donnée serait en rapport avec une meilleure adhérence de la souche sauvage aux polynucléaires neutrophiles [190]. En revanche, administré par voie intra-péritonéale, un mutant *hms* de *Y. pestis* conserve toute sa virulence pour la souris [12].

Si le système Hms ne joue pas de rôle dans le pouvoir pathogène du bacille de la peste à l'égard des rongeurs, en revanche, il est décisif pour le blocage du proventricule de la puce. En effet, un mutant *hms* est incapable de bloquer le proventricule de l'insecte [12]. Ainsi, le système Hms s'avère indispensable à l'épidémiologie de la peste car le blocage de cette formation digestive est considérée comme une étape indispensable à la transmission de la bactérie dans la nature.

# I.2.D. Les séquelles immunologiques

## I.2.D.1. L'uréase

La sous-unité UreB de l'uréase (enzyme dégradant l'urée) de Y. enterocolitica pourrait être impliquée dans les complications articulaires observées au décours d'une infection digestive [191-193]. En effet, l'injection intra-articulaire de cette protéine chez des rats pré-immunisés entraîne une inflammation des articulations, suivie d'une fibrose et d'un épaississement de la capsule articulaire [193]. De plus, Probst et co-auteurs ont montré que cette protéine est reconnue par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du liquide synovial de patients ayant développé une arthrite réactionnelle à *Yersinia* [194]. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus dans une autre étude puisqu'une souche de Y. enterocolitica ne produisant plus UreB induit chez le rat une arthrite réactive similaire à celle provoquée par la souche parentale [195]. Ainsi, il est probable que les lésions articulaires causées par l'injection de UreB *in situ* ne seraient pas spécifiques. Cette absence de spécificité résulterait du caractère cationique de UreB car des lésions analogues à celles provoquées par les sous-unités structurales peuvent être observées avec d'autres antigènes cationiques comme la sérum-albumine bovine méthylée.

### I.2.D.2. YadA et la fixation au collagène

YadA est responsable de l'attachement des bactéries au collagène de type I, II, III, IV, V et XI [81, 87, 196-198]. Plusieurs expériences ont démontré que le domaine protéique responsable de la liaison aux constituants de la matrice extracellulaire est localisé dans la tête de YadA (Figure 5), et plus précisément la région de la molécule comprenant les acides aminés 80 à 104 [87]. Par ailleurs, la substitution dans le motif HSSH (acides aminés en position 159 à 162) des résidus histidyl par des tyrosyl réduit significativement la capacité de liaison de YadA au collagène [81]. Enfin, le remplacement des acides aminés hydrophobes VAI présents dans l'un ou l'autre des 8 motifs répétés NSVAIGXXS abolit ou réduit fortement l'activité biologique de l'adhésine bactérienne [198].

La capacité de YadA a fixé le collagène a rapidement suggéré un rôle potentiel de cette protéine dans le développement de l'arthrite réactionnelle car le collagène est un constituant majeur du tissu articulaire. C'est pourquoi, le rôle de YadA a été étudié dans un modèle expérimental d'arthrite chez le rat. Les résultats obtenus ont révélé qu'un mutant *yadA* incapable de fixer le collagène *in vitro* induit une arthrite moins sévère que la souche sauvage [47, 199]. Ainsi, l'interaction entre la protéine YadA et le collagène semble nécessaire à *Y. enterocolitica* pour induire l'arthrite réactionnelle, mais d'autres facteurs bactériens sont certainement incriminés.

# I.2.D.3. Le superantigène

Les complications immunologiques, qui apparaissent au décours d'une infection à Yersinia, ont suggéré l'intervention éventuelle d'un superantigène. A partir d'un lysat cellulaire de Y. pseudotuberculosis, une substance mitogène a été découverte [200]. Elle est codée par le gène ypmA (Y. pseudotuberculosis-derived mitogen A) [201, 202]. Parce qu'elle induit la production d'IL-2 par les cellules mononucléés du sang périphérique ainsi que la prolifération des lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) uniquement en présence de cellules présentant des molécules du CMH de classe II, et qu'elle se fixe directement sur les molécules du CMH de classe II sans apprêtement préalable, YPMa a été classée parmi les superantigènes [203-205]. Deux autres allèles, ypmB et ypmC, ont été ensuite identifiés chez Y. pseudotuberculosis [202, 206]. Les séquences protéiques de YPMc et YPMa ne divergent que par un seul acide aminé [206] et YPMb présente 83% d'homologie avec YPMa [202]. Les trois superantigènes YPM sont synthétisés sous forme de précurseurs et sont clivés avant d'être sécrétés dans le milieu extérieur [206]. Une substance superantigénique capable de stimuler des lymphocytes T murins a été isolée également à partir d'un lysat de Y. enterocolitica [207]; bien que purifiée, la séquence du gène codant cette protéine n'a pas encore été publiée. Quant à Y. pestis, elle ne possède pas dans son génome le gène ypmA [208].

Le rôle du superantigène dans les complications d'une infection digestive par Y. *pseudotuberculosis* n'a jamais été vraiment démontré. Néanmoins, chez la souris YPMa exacerbe la virulence bactérienne, très probablement par stimulation du système immunitaire de l'hôte [206].

# **CHAPITRE II**

# L'UREASE

	Km	Activité	pН	Température	Masse moléculaire	
Bactéries	(mM)	spécifiqueª	optimal	optimale	(kDa)	Référence
Providencia rettgeri	10.5-71	30.6	7.5	ND	ND	[373]
Providencia stuartii	9.3	7100	ND	ND	230	[374]
Selenomonas ruminatium	2.2	1019	ND	ND	360	[375]
Spirula maxima	0.12	9.27	8.7	ND	232	[210]
Staphylococcus saprophyticus	7.36	150	6.8	ND	250	[376]
Streptococcus salivarius	3.5-4.1	ND	6.5-7	60°C	ND	[246]
Synechococcus WH7805	0.23	1300	8.6	45°C	420	[267]
Ureaplasma urealyticum	2.5	18000	7.2-7.5	ND	380	[377]
Yersinia enterocolitica	0.15	310	3.5-5.5	ND	ND	[270, 357]

 Tableau 2. Caractéristiques de quelques uréases bactériennes (suite)

<sup>a</sup>, exprimée en µmol NH<sub>3</sub>/min/mg de protéine

ND, Non determiné

Cette enzyme est très répandue dans le monde vivant. Elle est synthétisée par des eucaryotes (plantes, invertébrés, champignons, levures) et par de nombreux procaryotes (eubactéries et archéobactéries). La fréquence élevée, dans la nature, d'organismes uréolytiques est due au caractère ubiquiste de l'urée et au fait que les ions ammonium provenant de la dégradation de cet amide représentent une source d'azote très facilement assimilable. En plus de ce rôle nutritif, l'uréase participe à la virulence de champignons et de bactéries [209].

# II.1.A. Structure de l'uréase

La première uréase qui a été isolée et cristallisée est celle de *Canavalia ensiformis* (haricot) [210]. Ce n'est qu'en 1954, soit près de 30 ans plus tard, que la première uréase bactérienne (celle produite par *Bacillus pasteurii*) a été purifiée [210]. Depuis, près d'une trentaine d'autres uréases ont été caractérisées chez les bactéries (Tableau 2).

La purification et la caractérisation biochimique des différentes uréases ont montré que ces enzymes sont des protéines de très haut poids moléculaire (168 à 625 kDa) (Tableau 2). L'uréase des eucaryotes est constituée d'une seule sous-unité alors que celle des procaryotes en comporte trois : UreA, UreB et UreC. L'uréase des *Helicobacter* fait exception à la règle puisqu'elle n'est formée que de deux sous-unités : UreA et UreB [211]. La comparaison des séquences primaires des sous-unités de structure des uréases des procaryotes et des eucaryotes a indiqué que ces enzymes sont très conservées d'une espèce à l'autre. L'uréase des eucaryotes correspond à la fusion des trois sous-unités des procaryotes. Dans le cas particulier des *Helicobacter*, la sous-unité UreA correspond à la fusion des sous-unités UreA et UreB et, UreB, à la sous-unité UreC des autres bactéries [211]. Ainsi, l'uréase pourrait résulter de la fusion de plusieurs gènes ou de l'interruption de différents gènes au cours de l'évolution.

	Km	Activité	pН	Température	Masse moléculaire	
Bactéries	(mM)	spécifique <sup>a</sup>	optimal	optimale	(kDa)	Référence
Actinobacullus pleuropneumoniae	1.5	ND	7.7	65°C	337	[358]
Anabaena PCC 7120	0.25	ND	8.5	65°C	220	[359]
Anabaena cylindrical	ND	ND	8	30°C	197	[360]
Anabaena doliolum	115	240	7	40°C	228	[361]
Anabaena variabilis	0.05	ND	ND	ND	ND	[362]
Arthrobacter mobilis	3	2370	4.2	ND	290	[363]
Arthrobacter oxydans	12.5	219	7.6	ND	242	[364]
Bacillus pasteurii	40-130	1528	ND	ND	230	[365]
Brevibacterium ammoniagenes	18-72	3570	7	ND	200	[366]
Klebsiella pneumoniae	2.8	2200	7.75	79°C	224	[367, 368]
Helicobacter pylori	0.2	1500	7.5	43°C	625	[369]
Lactobacillus fermentum	2.7	ND	2	65°C	220	[370]
Leptolynbya boryana	0.25	ND	8.2	60°C	220	[359]
Methylophilus methylotrophus	3.8	ND	ND	ND	190	[263]
Morganella morganii	ND	2431	5.5	ND	ND	[357, 371]
Mycobacterium tuberculosis	0.3	101	7.2	60°C	ND	[264]
Prochlorococcus marinus	0.23	94.6	ND	60°C	168	[214]
Proteus mirabilis	13	2057	7.5	ND	250	[219]

Tableau 2. Caractéristiques de quelques uréases bactériennes.

L'urée est une molécule toxique, largement distribuée dans la nature. Produit du catabolisme azoté des purines et de l'arginine, cette molécule est éliminée avec les urines des mammifères. L'urée provient également de la dégradation de l'acide urique qui est sécrété par les reptiles, les oiseaux et un grand nombre d'insectes. L'urée est donc abondante dans le sol et l'eau. C'est une molécule relativement instable, qui peut être dégradée par l'uréase.

# II.1. L'uréase, une métallo-enzyme

L'uréase (urée amino-hydrolase, E.C.3.5.1.5) est une métallo-enzyme à nickel qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammonium et carbamate. En présence d'eau, le carbamate se décompose spontanément en ammoniaque et acide carbonique.

$$\begin{array}{c} O \\ H_2N - C - NH_2 + H_2O \end{array} \xrightarrow{uréase} NH_3 + H_2N - C - OH \end{array}$$

$$H_2N - C - OH + H_2O \longrightarrow NH_3 + H_2CO_3$$

Au pH physiologique, la forme « protonée » des deux molécules d'ammoniaque et la forme « déprotonée » de l'acide carbonique sont en équilibre. La réaction enzymatique aboutit à la production d'un ion carbonate et de deux ions ammonium ainsi qu'à une alcalinisation du milieu réactionnel.

 $H_2CO_3 \longrightarrow H^+ + HCO3^-$ 

 $2NH_3 + H_2O \longrightarrow 2NH_4^+ + 2OH^-$ 

La structure tridimensionnelle de l'uréase de *Klebsiella pneumoniae* [209], de *H. pylori* [212] et de *B. pasteurii* [213] a été établie par cristallographie. Les enzymes de *K. pneumoniae* et *B. pasteurii* sont des trimères (UreABC)<sub>3</sub> [209, 213] alors que l'uréase de *H. pylori* est un dodécamère [(UreAB)<sub>3</sub>]<sub>4 [212]</sub>. En raison de similitudes protéiques importantes d'une uréase à l'autre (près de 45% pour UreA, 35% pour UreB et 40% pour UreC), il est très probable que la structure quaternaire des autres uréases bactériennes soit également hétéro-trimérique. Toutefois, la structure quaternaire d'une uréase estimée à partir de son poids moléculaire laisse penser que celle-ci n'est pas toujours un hétéro-trimère. Par exemple, l'uréase de *Prochlorococcus marinus* (UreA, 11 kDa ; UreB, 13 kDa ; UreC, 63 kDa), dont le poids moléculaire a été estimé par chromatographie d'exclusion à 168 kDa, serait un hétero-dimère (UreABC)<sub>2</sub> [214].

Toutes les uréases décrites à ce jour nécessitent la présence de deux ions nickel dans leur site catalytique pour être active (métallo-enzyme à nickel) [215]. Le site actif de l'uréase de *K. pneumoniae* a été particulièrement étudié. Il est localisé dans la sous-unité structurale UreC et les résidus His-134, His-136, His-246, His-272, Asp-360 et Lys<sub>carbamate</sub>-217, qui sont conservés dans toutes les uréases bactériennes, interagissent avec deux atomes de nickel pour former le site actif de l'enzyme [209, 216, 217]. L'un des deux atomes d'azote des résidus His-34 et His-36, l'un des deux atomes d'oxygène des résidus Lys<sub>carbamate</sub>-217, Asp-360 et d'une molécule d'eau établissent des liaisons de coordination avec l'un des deux atomes de nickel. La liaison de coordination du deuxième atome de nickel met en jeu l'un des deux atomes d'azote des résidus Lys<sub>carbamate</sub>-217. Ce dernier acide aminé forme donc un pont entre les deux atomes de nickel du site actif [209, 216, 217]. D'autres acides aminés (Ala-167, His-219, Gly-277, His-320, Ala-363, et Met-364) constitueraient le site de fixation de l'urée et participeraient à la catalyse

enzymatique. Le résidu His en position 320 est impliqué directement dans la catalyse enzymatique alors que celui en position 219 permet la fixation du substrat *via* une liaison hydrogène [218].

# II.1.B. Caractéristiques biochimiques de l'enzyme

Les uréases bactériennes sont stables pendant plusieurs jours suivant leur extraction et purification, et leur stabilité peut être augmentée par l'EDTA et le  $\beta$ -mercaptoéthanol. [210]. Elles se différencient par leur masse moléculaire, leurs propriétés physico-chimiques (température et pH optimal d'activité) et leurs affinité pour l'urée (Km) et activité spécifique (Tableau 2).

Le pH optimal d'activité enzymatique est habituellement proche de la neutralité, sauf dans le cas des uréases des cyanobactéries et des lactobacilles qui sont actives respectivement à un pH basique et acide (Tableau 2). Le Km des uréases bactériennes est compris entre 0,05 et plus de 100 mM d'urée (Tableau 2). Une corrélation a été établie entre l'affinité de l'enzyme pour l'urée et la niche écologique de la bactérie productrice. Contrairement aux bactéries présentes dans des écosystèmes où la teneur en urée est élevée, les bactéries qui vivent dans des niches où la concentration en urée est basse produisent une uréase ayant communément un faible Km. Par exemple, *H. pylori* et *K. pneumoniae*, qui colonisent le tube digestif où la teneur en urée n'excède pas 10 mM, synthétisent une uréase ayant un Km respectivement de 0,2 et de 2,8 mM. Inversement, *P. mirabilis* qui infecte souvent le tractus urinaire (300 à 500 mM d'urée dans les urines), produit une uréase dont le Km est de 13mM [219].

# II.1.C. Localisation cellulaire de l'enzyme

Il est admis que les uréases des bactéries sont toutes localisées dans le cytoplasme. Néanmoins, chez H. pylori, bien que majoritairement trouvée dans le cytoplasme, l'enzyme est aussi détectée à la surface cellulaire [220]. L'absence d'un peptide signal dans les sousunités structurales UreA et UreB a suggéré la possibilité d'une sécrétion de l'enzyme par un système de sécrétion distinct de la Voie Générale de Sécrétion (système Sec). Cette hypothèse était supportée par des travaux de Vanet et co-auteurs montrant que l'uréase était en partie détectée dans le surnageant de culture alors que la ß-galactosidase (protéine non sécrétée et utilisée dans cette étude comme témoin de localisation sub-cellulaire) était présente uniquement dans le culot cellulaire [221]. Cependant, en utilisant la même technologie, mais en prenant comme contrôles le transporteur d'urée UreI (qui est situé dans la membrane cytoplasmique) et la Green Florescent Protein ou GFP (qui n'est pas produite par H. pylori et vraisemblablement pas sécrétée par la bactérie), Marcus et co-auteurs ont observé que la GFP et la protéine UreB étaient toutes deux présentes dans le surnageant de culture des bactéries [222]. Dans cette même étude, l'absence de détection de la β-galactosidase laissait penser que les données de Vanet et co-auteurs étaient très vraisemblablement un artefact de laboratoire. Ainsi, la présence de UreB à la surface de la bactérie résulterait d'une lyse cellulaire et non pas d'un export de la molécule [222].

# **I1.1.D.** Activation de l'apoenzyme (apouréase)

L'activation de l'uréase de K. pneumoniae a été très étudiée. In vitro, l'apoenzyme est activée par la présence d'ions nickel et bicarbonate; ce dernier est nécessaire à la formation de la lysine carbamate en position 217 [216]. In vivo, l'activation de l'uréase requiert les protéines auxiliaires UreD, UreF et UreG et, est facilitée par la protéine UreE. Le rôle des protéines auxiliaires n'est pas encore complétement compris. Des complexes UreD-Apoenzyme [223], UreD-UreF-Apoenzyme [224], UreD-UreF-UreG-Apoenzyme ont été identifiés dans des extraits de *K. pneumoniae* [225]. *In vitro*, dans des conditions optimales et en absence de protéines auxiliaires, l'apoenzyme a une activité spécifique de 400 U/mg ; celle-ci est augmentée après addition successive de UreD (~600-800 U/mg), UreD et UreF (~700-900 U/mg), UreD, UreF et UreG(~800-1500 U/mg) [226]. *In vitro*, l'activation de l'apoenzyme en absence ou en présence des protéines auxiliaires nécessite respectivement 100  $\mu$ M de Ni<sup>2+</sup> et 100 mM de bicarbonate et 100  $\mu$ M de bicarbonate et 20  $\mu$ M de Ni<sup>2+</sup>. Dans ces dernières conditions, plus physiologiques, l'hydrolyse du GTP est indispensable [227]. Les protéines auxiliaires seraient à l'origine d'un changement de conformation de l'apoenzyme nécessaire et indispensable à l'incorporation du nickel dans le site catalytique de l'enzyme [228]. *In vivo*, l'insertion du nickel est facilitée par la protéine UreE [229].

#### La proteine UreE

La protéine UreE est une protéine qui fixe l'ion nickel puis délivre le cation dans le site catalytique de l'enzyme selon un processus actif, dépendant du GTP [226]. Les protéines UreE de *K. pneumoniae* [230] et de *B. pasteurii* [231] ont été les mieux caractérisées. La protéine UreE de *K. pneumoniae* est un dimère et celle de *B. pasteurii*, un tétramère [230, 231]. La protéine UreE de *K. pneumoniae* fixe 5 à 6 ions nickel par dimère (constante d'affinité, 10  $\mu$ M) [232]. Elle présente dans sa région carboxy-terminale une queue poly-histidyl (10 des 15 derniers acides aminés) [233]. Un tel motif est également trouvé dans la région carboxy-terminale des protéines UreE d'autres bactéries telles que *Y. pseudotuberculosis, Proteus mirabilis* et *Ralstonia eutropha* [233]. Très tôt, l'importance de cette région particulière a été envisagée. En effet, des études avaient montré que (1) UreE participait à l'assemblage du site métallique de l'uréase [234], (2) fixait du nickel [232] et (3)

les protéines s'associant au nickel avaient une séquence primaire riche de résidus histidyl [235]. Cependant, la perte de cette queue poly-histidyl ne réduit que très modérément l'activation de l'uréase *in vivo* [235]. De plus, en l'absence de ce motif, la protéine conserve néanmoins sa capacité à fixer le nickel [233]. Ainsi, cette région ne serait pas impliquée dans l'activation de l'uréase. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les protéines UreE de *Ureaplasma urealyticum, Streptococcus salivarius, Bacillus* sp. TB-90, *Bacillus pasteurii* et *Helicobacter pylori* sont dépourvues de queue poly-histidyl [233].

L'étude cristallographique de UreE de K. pneumoniae (159 acides aminés) [230] et de B. pasteurii (147 acides aminés) [231] a montré que ces protéines sont constituées de deux domaines [230]. Le premier, dénommé domaine de fixation au peptide, comprend les 70 premiers acides aminés de la protéine et ressemble au domaine de la protéine de choc thermique Hsp-40 [230, 231]. Il comporte une crevasse hydrophobe qui permettrait à UreE d'interagir avec l'uréase ou les autres protéines auxiliaires UreD, UreF et UreG [230]. Le deuxième domaine, dénommé domaine de fixation au métal, est formé par les 70 acides aminés situés en aval du premier domaine ; il est semblable au domaine correspondant des ferrédoxines [230, 231]. C'est dans cette région que se situe l'interface entre les deux monomères [230, 231]. Chez K. pneumoniae, trois sites de fixation du nickel ont été caractérisés dans ce second domaine : résidus His-110, His-112 et His-96, ce dernier étant à l'interface des deux monomères [230]. Chez B. pasteurii, un seul site de fixation métallique (résidu His-100) a été caractérisé [231]. Le domaine de fixation du peptide module l'interaction avec l'apouréase et/ou les autres protéines auxiliaires alors que le domaine de fixation du métal contribue à délivrer le nickel dans le site actif de l'enzyme [230].



**Figure 11.** Organisation génétique du locus uréase de quelques bactéries. En dégradé gris, gènes de strucures ; en dégradé jaune, gènes auxiliaires ; en dégradé vert, gènes codant des transporteurs de nickel ; en rose, gène codant un transporteur d'urée ; en rouge ; gènes régulateurs ; le gène orfX a une fonction inconnue. La taille de gènes n'a pas été respectée.

## La protéine UreG

La protéine UreG est la protéine la plus conservée des protéines auxiliaires. Elle possède un motif (la boucle P) présent chez les protéines fixant le GTP ou l'ATP. Isolément, la protéine UreG n'hydrolyse ni ne fixe le GTP ou l'ATP [227]. La fixation du GTP sur UreG dépend de l'interaction de la protéine avec les autres protéines. En effet, le GTP n'augmente l'activation de l'apoenzyme que lorsque celle-ci est associée au complexe UreG-UreD-UreF [227]. De plus, l'activation enzymatique n'est possible que si la boucle P de UreG est intacte [227]. La raison pour laquelle l'hydrolyse du GTP active l'apouréase n'est pas encore complètement comprise. La fixation du GTP conduirait à un changement de conformation du complexe apoenzyme-protéines auxiliaires, ce qui aurait pour conséquence de favoriser l'accès, au site catalytique, du nickel ou du dioxyde de carbone.

# II.2. La biosynthèse des uréases bactériennes

# II.2.A. Les organisations génétiques des régions uréasiques

Le locus uréase est habituellement localisé sur le chromosome bactérien. Néanmoins, chez *E. coli, Providencia stuartii, Salmonella cubana* [236] et *Clostridium perfringens* [237], il est porté par un plasmide. Dans tous les cas, les gènes de biosynthèse de l'uréase peuvent être regroupés dans deux catégories (Figure 11). La première regroupe trois gènes de structure, *ureA, ureB* et *ureC*, sauf chez *Helicobacter* (*H. pylori, H. heilmannii, H. felis, H. hepaticus, H. mustelae*) qui ne possède que deux gènes de structure, *ureA* et *ureB*. Néanmoins, il convient de rappeler que le gène *ureA* de *Helicobacter spp.* correspond à la fusion traductionnelle des gènes *ureA* et *ureB* des autres bactéries uréolytiques et, que le gène *ureB* est équivalent au gène *ureC* [211, 238-240, 241, 242]. Ces gènes codent les sous-unités formant l'apoenzyme. Plus particulièrement, le gène *ureC* spécifie la protéine constituant le site catalytique de l'enzyme.

La deuxième catégorie englobe les gènes auxiliaires; ils sont adjacents aux gènes de structure. Elle peut être arbitrairement divisée en deux sous-groupes. Le premier comprend les gènes codant les protéines nécessaires à la production d'une enzyme active. Quatre de ces gènes sont présents (sauf exception) au locus uréase : ureD (dénommé ureH chez H. pylori), ureF, ureG et ureE, sont toujours présents au locus uréase des bactéries. Deux autres gènes auxiliaires ont été identifiés : ureH (qui, précisons-le, ne présente aucune identité avec le gène ureH de H. pylori) chez Bacillus TB-90 [243] et ureJ chez Bordetella bronchiseptica [244]. Parmi tous ces gènes, seuls ureD (ureH de H. pylori), ureF et ureG sont indispensables pour que l'enzyme soit active in vivo. Ils codent des protéines qui permettent une conformation correcte de l'enzyme avant l'insertion du nickel au sein du site catalytique. En revanche, les gènes *ureE* et *ureH* ne sont pas indispensables puisque leur mutation ne conduit pas à une perte de l'activité enzymatique. Le gène *ureE* code une protéine fixatrice de nickel participant directement à l'activation de l'uréase puisque qu'elle délivre le cation dans le site catalytique de l'enzyme [226]. Le gène ureH de Bacillus sp. TB-90 interviendrait indirectement dans l'activation de l'uréase car il coderait un transporteur de nickel [243]. Enfin, le gène urel identifié dans le locus ure de Helicobacter spp. [245], S. salivarius [246] et Lactobacillus fermentum peut être assimiler arbitrairement à un gène auxiliaire. Ce gène ne participe pas à la production d'une enzyme catalytiquement active. En effet, sa mutation ne retentit pas sur l'activité enzymatique d'un lysat cellulaire [247]. En fait, le gène urel code un transporteur d'urée et participe à l'incorporation du substrat ce qui explique que sa mutation diminue, en revanche, fortement l'activité uréase déterminée sur cellules intactes lorsque les bactéries subissent un choc acide [248].

Deux types d'organisation génétique du locus uréase ont été décrits : l'un est propre aux cyanobactéries alors que l'autre est commun à toutes les espèces bactériennes uréolytiques. Contrairement au locus *ure* des cyanobactéries, où les gènes *ureABCD* sont orientés en sens opposé des gènes auxiliaires *ureEFG* (Figure 11), les gènes auxiliaires et de structure des autres espèces bactériennes ont la même polarité (Figure 11). Les gènes *ureABCEFG* sont toujours contigus alors que le gène *ureD* peut avoir une position variable, soit en amont des gènes de structure *ureABC*, soit en aval des gènes auxiliaires *ureEFG* (Figure 11). Les autres gènes auxiliaires mis en évidence que chez certaines bactéries, ont également une situation différente selon l'espèce considérée. Ainsi, chez *Helicobacter*, le gène *ureI* est situé entre les gènes *ureB* et *ureE* [211, 238-240, 241, 242] alors que chez *S. salivarius*, il est positionné en amont des autres gènes du locus uréase (Figure 11) [246]. Chez *Bacillus* sp. TB-90, le gène *ureH* est en aval du gène auxiliaire *ureD* [243] alors que chez *B. bronchiseptica*, le gène *ureJ* est localisé entre les gènes de structure *ureA* et *ureB* [244]. Il convient de mentionner que *B. bronchiseptica* est la seule bactérie pour laquelle un gène auxiliaire est intercalé entre des gènes de structure.

Les gènes *ure* sont organisés en une ou plusieurs unités transcriptionnelles. D'une manière générale, l'ensemble des gènes constitutifs du locus peut former un seul et même opéron puisque les espaces inter-géniques sont généralement de petite taille. Chez *H. pylori*, les gènes de structure et auxiliaires forment deux unités transcriptionnelles distinctes [249]. De plus, des unités transcriptionnelles ne comprenant pas la totalité des gènes auxiliaires ont été également décrites comme chez *P. mirabilis* [250]. Enfin, chez *S. salivarius*, les gènes auxiliaires et de structure forment un opéron mais les gènes sont séparés par un terminateur de transcription faible à l'origine d'une production plus importante d'ARNm spécifiques des gènes *ureIABC* que de la totalité des gènes de l'opéron [251].

# II.2.B. La régulation de l'activité uréolytique

Les gènes *ure* sont exprimés de façon constitutive chez certaines entérobactéries (*Morganella morganii, Enterobater spp.*) et chez des bactéries hydrotelluriques (*B. pasteurii, Anabaena variabilis*). En général, leur activité uréolytique est moins importante que celle des microorganismes régulant leur locus uréase en réponse à un stimulus environnemental. Cependant, chez la plupart des bactéries, la production et l'activité de l'uréase sont soumises à une régulation à l'étape transcriptionnelle et parfois post-transcriptionnelle

# La régulation par l'urée

L'induction de la synthèse d'une uréase par l'urée a été mise en évidence chez plusieurs entérobactéries : *P. mirabilis* [219], *P. vulgaris* [210], *E. coli*, *P. stuartii* et *S. cubana* [236]. Chez celles-ci, la régulation de la biogenèse de l'uréase dépend du gène *ureR* qui est adjacent à *ureD* mais transcrit dans le sens opposé des gènes de structure et auxiliaires. La protéine UreR est un membre de la famille des activateurs transcriptionnels AraC [252, 253] capables, sous forme dimérique, de s'associer à l'ADN grâce à une structure putative en hélice-tour-hélice dans sa région carboxy-terminale [254]. Cet activateur contrôle l'expression du locus uréase ainsi que celle de son propre gène. En effet, deux promoteurs dont l'activité est dépendante de l'urée et de UreR ont été identifiés en amont du gène *ureR* et du locus uréase [255]. Les protéines UreR de *P. mirabilis, E. coli, P. stuartii* et *S. cubana* partagent 67% d'identité et sont fonctionnellement interchangeables [256].

Un modèle de régulation a été proposé pour tenter d'expliquer le rôle de l'urée dans l'activation transcriptionnelle du locus *ure* [257]. En absence à la fois d'urée et d'UreR, l'ARN polymérase peut se fixer sur le promoteur de *ureR* mais pas sur celui contrôlant la

transcription du locus uréase : seul le gène *ureR* est donc transcrit, mais faiblement. En absence seulement d'urée, UreR peut se fixer à la fois sur le promoteur de son propre gène et sur celui du locus uréase. Toutefois, la faible concentration intracellulaire de UreR ainsi que la faible affinité du régulateur pour ses sites de fixation à l'ADN ne permet pas à l'ARN polymérase d'initier la transcription du locus uréase et d'amplifier celle du gène ureR. Quand l'urée est présente dans le milieu, UreR fixe l'amide et subit alors un changement de conformation qui a pour effet d'augmenter l'affinité du régulateur pour ses sites de fixation à l'ADN. Dans ces conditions, UreR, qui est fermement associé au promoteur du locus uréase et de son propre gène, permet alors à l'ARN polymérase d'agir : l'uréase est produite et la concentration intracellulaire de UreR s'élève. L'augmentation de l'affinité de UreR pour son site de fixation aboutit à la formation d'un complexe ADN-UreR stable qui favorise la constitution du complexe ADN-régulateur et la transcription de *ureR* ainsi que du locus *ure*. Le mécanisme par lequel UreR active la transcription génique est encore inconnu. La fixation de UreR sur l'ADN pourrait induire une modification de la courbure de l'ADN. Enfin, signalons qu'en absence d'urée, la transcription de ureR est inhibée par la protéine de type histone H-NS [258].

## La régulation par l'azote

La régulation de l'expression du locus uréase par l'azote a été mise en évidence chez Actinomyces naeslundii WVU45 [259], Bacillus subtilis [260], Corynebacterium glutamicum [261], C. perfringens, C. glutamicum, C. diphtheriae, C. callunae, C. ammoniagenes [237], K. pneumoniae [262], Methylophilus methylotrophus [263], M. tuberculosis [264], Pseudomonas aeruginosa [265], Rhizobium meliloti [265], R. capsulatus [266] et certaines cyanobactéries [267].

Chez K. pneumoniae, la régulation dépend du système de régulation générale de l'azote Ntr qui implique le système de régulation à deux composants NtrC/NtrB (NR<sub>I</sub>/NR<sub>II</sub>), le facteur alternatif  $\sigma^{54}$  (NtrA) et la protéine de transduction du signal P<sub>II</sub> [262]. Chez les bactéries entériques, ce système de régulation contrôle également l'expression des gènes de la glutamine synthétase, de la glutamate déhydrogénase et de plusieurs autres impliqués dans le catabolisme de composés azotés. Lorsque la concentration d'azote est faible, le détecteur du signal NtrB s'auto-phosphoryle et transmet le groupement phosphate à la protéine régulatrice NtrC. NtrC, une fois phosphorylée, active alors la transcription des gènes dont les promoteurs dépendent du facteur alternatif  $\sigma^{54}$  [262]. Parmi ces gènes, figure nac (nitrogen assimilation control) qui gouverne la synthèse d'une protéine de 32 kDa appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels de type Lys-R [262]. Une fois produite, Nac active la transcription du locus uréase de la bactérie après fixation dans la région promotrice de ureD [262]. Lorsque la concentration d'azote s'élève dans le milieu, la protéine de transduction du signal P<sub>II</sub> inhibe la phosphorylation de NtrB. Dans ces conditions, (1) NtcC n'est pas phosphorylée et (2) Nac et l'uréase ne sont plus produites [262]. Chez B. bronchiseptica, un gène (bbuR, Bordetella bronchiseptica urease regulator) dont le produit est homologue au régulateur Nac, est présent en amont du locus uréase [244]. La présence d'un site putatif de fixation de BbuR, similaire à celui de Nac, dans le promoteur du locus laisse penser que la concentration en azote dans le milieu régulerait l'expression de l'uréase chez Bordetella.

L'expression du locus uréase de *R. capsulatus* est également contrôlée par le système Ntr [266] mais, chez cette bactérie, NtrC se fixe dans la région promotrice du locus uréase indépendamment du facteur alternatif  $\sigma^{54}$  [266]. Chez *B. subtilis* d'autres protéines interviennent : GlnR, TnrA, CodY. La transcription du locus uréase est activée par la protéine TnrA et est réprimée par les protéines GlnR et CodY lorsque l'azote, dans le milieu de croissance, est présent respectivement en faible et en forte concentration [268].

Enfin, dans le cas de *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. callunae*, *C. ammoniagenes* l'activité uréolytique de ces microorganismes est stimulée en absence d'azote [269]. Chez *C. glutamicum*, il ne s'agit pas d'une régulation transcriptionnelle puisque la quantité d'ARNm spécifiques produits est identique quelles que soient les conditions de croissance auxquelles est soumise la bactérie [269].

# La régulation par la densité cellulaire

Une augmentation de l'activité uréolytique selon la phase de croissance des bactéries a été observée chez *Y. enterocolitica* [270], *S. salivarius* [271], *E. coli* (pathovar EHEC) [272] et *B. subtilis* [268]. Chez les trois premières espèces, le mécanisme de régulation mis en jeu est encore inconnu. Néanmoins, chez *Y. enterocolitica*, il a été démontré que cette régulation n'impliquait pas le facteur alternatif  $\sigma^{S}$  spécifique de la phase stationnaire [270].

Chez *B. subtilis*, la régulation de l'activité uréolytique en fonction de la phase de croissance met en jeu la protéine CodY et le facteur alternatif  $\sigma^{H}$ . CodY inhibe la transcription des gènes *ure* lorsque la bactérie est en phase exponentielle de croissance ou qu'elle se multiplie dans un milieu minimum [268]. Lorsque *B. subtilis* est en début de phase stationnaire et se multiplie dans un milieu pauvre, la transcription du locus uréase est activée par le facteur  $\sigma^{H}$  qui régit, avec d'autres facteurs, la sporulation de la bactérie [268].

# La régulation par la température

Dans le cas de Y. enterocolitica et B. bronchiseptica, l'aptitude à dégrader l'urée est régulée par la température [244, 270]. L'activité uréolytique de Y. enterocolitica est plus faible quand la culture de la bactérie a été réalisée à 37°C plutôt qu'à 28°C. Les gènes

responsables de cette expression différentielle n'ont pas encore été identifiés. Une modification de la courbure de l'ADN pourrait être responsable du contrôle génétique [273].

Chez *B. bronchiseptica*, le locus *ure* et les gènes de virulence font partie d'un même virulon [244] : le système à deux composants BvgA (répresseur transcriptionnel)-BgvS (capteur du signal). Ce système de régulation contrôle l'expression génique en fonction de la température et de la concentration en sulfate de magnésium et d'acide nicotinique [244]. Le locus *ure* pourrait être aussi régulé directement par la température car une activité uréolytique de bas niveau est détectée à 30°C, indépendamment de la concentration en sulfate de magnésium dans le milieu [244]. Le mécanisme régulateur n'a pas encore été étudié.

# La régulation par le pH

Le pH régule l'activité uréolytique chez S. salivarius [251], E. coli EHEC (souches productrices d'uréase) [272] et H. pylori [249], vraisemblablement à un niveau transcriptionnel dans le cas de S. salivarius [251]. La production de l'uréase par H. pylori dépendrait d'un mécanisme post-transcriptionnel mettant en jeu la stabilité des ARNm en fonction du pH [249]. A pH acide, les ARNm spécifiques de ureAB, ureIEFGH et ureABIEFGH seraient stables et UreE, qui est nécessaire à l'incorporation du nickel dans le site catalytique de l'enzyme, deviendrait fonctionnelle. UreE serait produite à partir des transcrits ureIE', ureIE'' et ureABIE' obtenus après un clivage spécifique des ARNm de ureIEFGH et ureABIEFGH [249]. A pH acide, le clivage des ARNm spécifiques de ureIEFGH et ureABIEFGH [249]. A pH acide, le clivage des ARNm spécifiques de ureIEFGH et ureABIEFGH [249]. A pH acide, le clivage des ARNm spécifiques de ureIEFGH et ureABIEFGH [249]. A pH acide, le clivage des ARNm spécifiques de ureIEFGH et ureABIEFGH [249]. A pH acide, le clivage des ARNm spécifiques de ureIEFGH et ureABIEFGH donneraient naissance, entre autres, aux transcrits ureIE', ureIE'' et ureABIE' alors qu'à pH neutre, seul le transcrit ureIE' serait produit [249]. De plus, ce dernier est synthétisé en moindre quantité à pH neutre qu'à pH acide. Le mécanisme par lequel le clivage spécifique pourrait s'effectuer est encore inconnu [249]. Ces coupures seraient réalisées par un complexe enzymatique composé de l'endoribonucléase RNase III

(produit du gène *rrnC*) clivant l'ARN double brin, d'une exoribonucléase PNPase (produit du gène *pnp*) dégradant l'ARNm depuis sa région 3', d'une hélicase à ARN (produit du gène *deaD*) et d'une polymérase (produit du gène *papS*) qui, en ajoutant une extension poly-A à l'ARNm, faciliterait sa dégradation [249]. Le site de coupure de ces ARNm pourrait être situé dans des séquences palindromes (potentielles sites cibles de l'endoribonucléase) de *ureE* [249].

## La régulation par les carbohydrates

Chez *S. salivarius*, l'activité uréolytique est induite par la présence de carbohydrates dans le milieu, mais uniquement lorsque le pH du milieu est acide [271]. Ce type de régulation met en jeu le système PTS (*phosphoenolpyruvate (PEP) : carbohydrate phosphotransferase systems*) [274] qui assure le transport et la phosphorylation d'un certain nombre de glucides dits « glucides PTS », le mouvement cellulaire vers cette source carbonée, et la régulation de voies métaboliques [275]. Ce système catalyse la réaction suivante :

 $PEP_{(intracellulaire)} + glucide_{(extracellulaire)} \rightarrow pyruvate_{(intracellulaire)} + glucide-P_{(intracellulaire)}$ 

La phosphorylation du glucide est couplée à son transport à travers la membrane cytoplasmique et l'énergie nécessaire au processus est fournie par le PEP. La phosphorylation du sucre à partir du PEP nécessite la transmission du groupement phosphate grâce à l'enzyme I (EI), puis la protéine HPr et, finalement l'enzyme II (EII) [275].

Un modèle de régulation de l'activité uréolytique dépendant du pH et de la présence de glucide dans le milieu a été proposé. Il met en jeu un répresseur (encore indéterminé) du locus uréase, dont l'activité est modulée par le pH et la protéine EI du système PTS [274, 276]. A pH neutre, l'expression du locus uréase serait réprimée en raison de la fixation du répresseur

sur la région promotrice. Lorsque le pH est acide, l'affinité du répresseur pour ses sites spécifiques de fixation diminuerait [276]. A pH acide, le système PTS modulerait l'activité de ce régulateur par des réactions de phosphorylation [276]. A de faibles concentrations en glucide, le répresseur serait phosphorylé par l'intermédiaire de la protéine EI : son activité serait ainsi augmentée (uréase réprimée) [276]. A de faibles concentrations en glucide, EI, présente majoritairement sous sa forme phosphorylée, transmettrait son groupement phosphate de la protéine EI serait préférentiellement transféré sur le sucre plutôt que sur le répresseur qui resterait alors sous sa forme déphosphorylée (uréase active).

# La régulation par le nickel

Les études utilisant une fusion transcriptionnelle *ureA-lacZ* ont mis en évidence que la transcription du locus uréase de *H. pylori* est également induite par l'addition de nickel dans le milieu de culture [277]. L'utilisation d'un mutant *fur* de *H. pylori* a révélé que cette activation transcriptionnelle dépend de la protéine Fur. Le mécanisme régulateur de cette protéine est encore mystérieux. Néanmoins, la participation de Fur dans la régulation de l'activité uréolytique de souches de *E. coli* (pathovar EHEC) ainsi que l'existence d'un site de fixation de cette protéine dans la région promotrice du locus uréase de ces souches [272], suggèrent que Fur interagirait directement avec le promoteur du locus *ure* de *H. pylori*.

# II.3. L'uréase et le pouvoir pathogène bactérien

Lors de la colonisation d'un hôte, les bactéries doivent mettre en place des voies métaboliques synthétisant des composés absents ou indisponibles chez l'hôte et, qui sont indispensables à leur croissance. Parmi l'ensemble des protéines impliquées dans le métabolisme bactérien, l'uréase participerait à l'assimilation de l'azote. Outre son rôle nutritif, cette enzyme confère également un pouvoir pathogène à certaines bactéries. En effet, la forte production d'ammoniaque générée par l'uréase à partir d'urée est un facteur clef dans la persistance de pathogènes chez l'hôte et elle est responsable de dommages tissulaires. Les lésions provoquées par l'uréolyse seraient dues d'une part, à l'élévation du pH et, d'autre part, à la formation de produits dérivés de l'ion ammonium.

# II.3.A. Les bactéries uréolytiques de la cavité buccale

Une activité uréolytique globale de 1 µmol de NH<sub>3</sub>/min/mg de matière sèche est détectée dans la salive et la plaque dentaire de l'Homme [278]. Toutes les espèces bactériennes contribuant à cette activité n'ont pas été encore identifiées. *S. salivarius* est probablement l'espèce qui contribue le plus à l'uréolyse dans la cavité buccale [279]. Néanmoins, cette bactérie n'est pas un constituant prédominant du biofilm dentaire dans lequel les bactéries uréolytiques sont majoritairement des *Actinomyces* et des *Haemophilus* [280]. L'hydrolyse microbienne de l'urée (1 à 10 mM dans la salive) pourrait être à l'origine du maintien du pH neutre et de la composition de la flore de la cavité buccale.

Au cours de l'alimentation, le pH de la plaque dentaire s'acidifie et les dents se déminéralisent; ensuite, le pH de la cavité buccale devient neutre et les dents se reminéralisent. Le développement de la carie résulte d'un processus impliquant des cycles de déminéralisation et re-minéralisation des dents [278]. C'est lorsque les phases de déminéralisation dominent que les lésions des dents surviennent [278]. Contrairement au processus d'acidification, les processus d'alcalinisation et d'homéostasie du pH de la plaque dentaire sont beaucoup moins bien compris [278]. Les mécanismes qui contribueraient à l'élévation du pH impliqueraient une élimination des acides et des sucres présents dans la

salive, un effet tampon par des composants salivaires ou bactériens et la production de composés alcalins par les bactéries de la plaque dentaire [278]. L'activité uréolytique des bactéries colonisant les gencives pourrait contrebalancer l'activité glycolytique microbienne et empêcher l'acidification de la plaque dentaire et, par conséquent, les cycles d'acidification à l'origine de la formation des caries [281]. En effet, une étude in vitro a montré que l'expression du locus uréase de S. salivarius chez Streptococcus mutans, qui est naturellement incapable de dégrader l'urée, permettait à la bactérie de produire une activité uréolytique suffisante pour neutraliser l'acidification du milieu consécutive à la glycolyse produite [281]. De plus, in vivo, il a été démontré que l'augmentation du pH de la plaque dentaire après addition d'urée dans le milieu favorise la re-minéralisation de l'émail dentaire [278]. Ces résultats semblent être confirmés par des observations faites chez le rat. En effet, chez cet animal, il a été constaté qu'une concentration d'urée de 1 à 10 mM dans la salive était insuffisante pour prévenir la formation de la carie dentaire, même en présence d'organismes produisant une uréase active (S. mutans exprimant l'uréase de S. salivarius) [281]; néanmoins, l'ingestion périodique d'eau contenant 50 mM d'urée était suffisante pour empêcher la cariogenèse [281]. Il convient de mentionner que lors de ces expériences, la prévention de la carie dentaire avait été obtenue en présence d'une grande quantité de bactéries cariogéniques [281]. Ainsi, l'hydrolyse de l'urée par l'uréase des bactéries uréolytiques (S. salivarius, A. naeslundii) permettrait, en alcalinisant le milieu, la prévention de la carie dentaire. L'ensemble de ces résultats expliquerait pourquoi des individus ayant une salive riche d'urée (50 à 80 mM) n'ont qu'exceptionnellement des caries, même lorsque leur alimentation est principalement à base de glucides [278].

La formation et le dépôt de tartre sur les dents résulteraient d'un pH alcalin comme c'est le cas pour la constitution des calculs lors d'une infection du tractus urinaire par des bactéries uréolytiques. Néanmoins, aucune expérience n'a démontré une quelconque corrélation entre
la formation du tartre et l'uréolyse. Cependant, les patients dont la salive est riche en urée produisent des quantités importantes de tartre [278].

La maladie périodontale est une maladie inflammatoire consécutive à un bouleversement de l'écosystème bactérien de la dent et de son tissu de soutien. Il s'ensuit une augmentation marquée du nombre de bactéries anaérobies à Gram négatif dans cette région [278]. En absence de traitement, cette maladie aboutit à la destruction progressive du periodonte et de l'os alvéolaire et, finalement, au déchaussement des dents [278]. Certaines observations suggèrent que les ions ammonium produits lors de l'uréolyse contribueraient au développement des lésions tissulaires caractérisant cette maladie. Chez des individus sains, il n'y aurait pas de bactéries uréolytiques en quantité importante sur le collet de la dent. Chez les malades ayant des poches périodontales enflammées, la concentration d'urée diminue brutalement à ce niveau malgré une libération importante d'urée in situ liée à l'intense réaction inflammatoire. Simultanément, la concentration en ions ammonium et le pH augmentent dans cette région, ce qui signifie que l'urée y est rapidement dégradée par les bactéries. Néanmoins, aucun accroissement du nombre de bactéries uréolytiques dans la poche périodontale enflammée n'a été jusqu'à présent démontré [278]. L'origine de l'augmentation de l'hydrolyse de l'urée demeure donc inconnue. L'inflammation puis la destruction du tissu de soutien de la dent seraient la conséquence d'un effet cytotoxique des ions ammonium produits en grande quantité sur les fibroblastes et les cellules du système immunitaire [278]. Par ailleurs, l'élévation du pH aggraverait la maladie en augmentant l'activité de protéases tissulaires telle que la collagénase [278].

#### II.3.B. H. pylori, une bactérie uréolytique pathogène de l'estomac

*H. pylori* est une bactérie colonisant l'antre gastrique de l'Homme, responsable de gastrites chroniques atrophiantes ou non, de duodénite, d'ulcère gastro-duodénal, d'adénocarcinome et

de lymphome (de type MALT) gastriques [282]. La persistance de cette bactérie dans l'estomac cause une inflammation active et prolongée, qui est caractérisée par une infiltration de polynucléaires neutrophiles et de monocytes dans la muqueuse gastrique [282] et une augmentation de la proportion de cellules de l'épithélium gastrique en apoptose [283]. L'uréase, qui représente 6% des protéines totales de la bactérie, a un rôle crucial dans la persistance de *H. pylori* au niveau de la muqueuse gastrique.

Des études de résistance à l'acidité in vitro ont clairement démontré que l'uréase de H. pylori joue un rôle indispensable dans la survie des bactéries lorsque celles-ci sont dans un environnement acide en présence d'urée [247]. Cette résistance à l'acidité est due à l'alcalinisation du milieu consécutive à l'hydrolyse de l'urée. Il s'ensuit qu'un mutant non uréolytique est incapable de résister à l'acidité in vitro et de coloniser l'estomac dans un modèle d'infection expérimentale [247]. L'uréase est à la fois à la surface de la membrane externe et dans le cytoplasme de la bactérie. L'uréase membranaire jouerait un rôle prépondérant dans la résistance à l'acidité [284] puisque celle-ci est diminuée uniquement lorsque l'activité liée à l'uréase membranaire est spécifiquement inhibée [284]. Lorsque l'activité de l'uréase cytoplasmique et membranaire sont toutes deux inhibées, le niveau de résistance à l'acidité est identique à celui observé lorsque seule l'activité de l'uréase membranaire est abolie [284]. Enfin, le rôle de l'uréase membranaire dans la résistance à l'acidité est renforcé par le fait que l'enzyme purifiée n'est pas dénaturée à pH acide lorsqu'elle est placée dans des conditions in vitro mimant l'environnement rencontré dans l'estomac (milieu non tamponné et agitation douce) [212]. Cependant, d'autres expériences ont révélé que l'uréase cytoplasmique était indispensable à la survie bactérienne dans des conditions acides. En effet, il a été montré que l'uréase membranaire est inactive et irréversiblement dénaturée à pH < 5 alors que l'uréase cytoplasmique est activée à pH acide.

De plus, des études réalisées sur la protéine UreI ont renforcé l'hypothèse que l'uréase cytoplasmique confère à *H. pylori* une résistance à l'acidité [248].

La capacité de H. pylori à coloniser l'estomac est aussi due, en partie, à l'aptitude de la bactérie à résister à la phagocytose. Cette propriété met en jeu, là encore, l'uréase. L'incapacité d'un mutant non uréolytique à coloniser l'estomac du porcelet gnotobiotique maintenu dans un état d'achlorhydrie, indiquait que le rôle de l'uréase dans la colonisation gastrique n'était pas limité seulement à la résistance à l'acidité [285]. Parmi les molécules sécrétées par les cellules du système immunitaire, le peroxynitrite exerce une puissante activité bactéricide [282]. H. pylori supprime l'action de ce dernier composé grâce à son uréase. En effet, il a été démontré d'une part, que l'activité du peroxynitrite sur H. pylori est atténuée par la présence d'urée dans le milieu réactionnel et, d'autre part, qu'un mutant non uréolytique ou qu'une souche sauvage dont l'activité uréolytique a été inhibée ne résistent plus à ce composé oxygéné [282]. Alors que la résistance à l'acidité est due à la production d'ammoniaque lors de l'uréolyse, la résistance au peroxynitrite dépend de la production de l'acide carbonique [282]. Cette résistance est attribuable à l'uréase membranaire puisque la bactérie est plus sensible au peroxynitrite lorsque l'activité uréolytique dépendante de l'uréase membranaire est inhibée [282]. Contrairement à un mutant ureB qui ne produit pas d'uréase, un mutant ureG qui synthétise une uréase sous forme inactive (apoenzyme) résiste aussi efficacement que la souche sauvage à l'action des granulocytes humains : c'est donc la protéine elle-même et non son activité qui permet à la bactérie de résister à la phagocytose, selon un mécanisme restant à decouvrir [286].

La réponse inflammatoire associée à la gastrite et la duodénite induite par *H. pylori* résulterait d'une élévation de la production de cytokines inflammatoires et des composés

oxygénés après activation des macrophages résidents de la lamina propria et des monocytes circulant à travers le mucus [287].

L'uréase contribue à la réaction inflammatoire en recrutant les cellules du système immunitaire. En effet, un sérum anti-uréase inhibe le pouvoir chimiotactique d'un surnageant de culture de *H. pylori* à l'égard des polynucléaires neutrophiles et des monocytes [288]; de plus, l'uréase purifiée est capable d'induire la migration de ces cellules [288]. Le chimiotactisme de l'uréase dépend d'une séquence de 20 acides aminés située dans la région amino-terminale [288].

L'apouréase participe également à la réaction inflammatoire locale en déclenchant la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales gastriques (IL-6 et TNF $\alpha$ ) [289], les monocytes (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ ) [290] et les macrophages (IL-1 $\beta$ , IL-6, et TNF $\alpha$ ) de la muqueuse gastrique [291]. En stimulant la sécrétion de l'IL-6, l'uréase active donc les cellules du système immunitaire : monocytes, macrophages, lymphocytes T et B.

L'apoenzyme est en partie responsable de l'augmentation de la production, par les granulocytes, des formes activées de l'oxygène. En effet, le mutant *ureG* stimule plus l'explosion oxydative dans les granulocytes que le mutant *ureB* [286]. Toutefois, il semble que l'uréase n'agisse pas directement car la protéine purifiée est incapable de donner cet effet [286]. L'uréase et l'apoenzyme pourraient améliorer la survie de *H. pylori* dans le phagocyte ; son incapacité à dégrader la bactérie conduirait à une surproduction de composés oxygénés toxiques pour les cellules de l'estomac [286].

Au total, le recrutement des cellules du système immunitaire, la sécrétion de cytokines proinflammatoires, l'explosion oxydative excessive par les phagocytes seraient la cause de l'altération de muqueuse gastrique infectée par *H. pylori*. La production de TNF $\alpha$  par les cellules du système immunitaire, induite en partie par l'uréase, déclencherait la sécrétion de gastrine qui, en retour, augmenterait la sécrétion de l'acide chlorhydrique dans l'estomac. Par

65

ailleurs, cette cytokine produite majoritairement par la muqueuse gastrique infectée par *H*. *pylori*, en présence d'ammonium, accroît la proportion de cellules épithéliales gastriques en apoptose. [283].

Lorsque l'estomac est colonisé par *H. pylori*, la quantité de molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH-II) présentes à la surface des cellules gastriques augmente [292]. Les molécules du CMH-II ont pour rôle de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Néanmoins, la reconnaissance des molécules du CMH-II par le récepteur T des lymphocytes (TcR) ou un superantigène bactérien peut également conduire à l'apoptose des cellules exprimant le CMH-II. *H. pylori* s'attache aux cellules épithéliales par l'intermédiaire des molécules du CMH-II et induit, secondairement, l'apoptose. Ces événements dépendent de l'uréase présente à la surface de la bactérie [292]. En effet, il a été démontré que l'uréase provenant d'un extrait de membrane externe, se fixe aux cellules exprimant les molécules de CMH-II comme le fait un superantigène [292].

L'adhérence de *H. pylori*, *via* l'uréase, aux molécules de CMH-II expliquerait ainsi l'incapacité d'un mutant non uréolytique à infecter un animal dont l'estomac est maintenu en hypochlorhydrie [292].

#### II.3.C. Les bactéries uréolytiques uropathogènes

Les bactéries uréolytiques sont fréquemment associées aux infections du tractus urinaire, en particulier, chez les patients ayant des malformations anatomiques ou fonctionnelles du rein et/ou de la vessie et, eventuellement porteurs de sonde urinaire [265]. Les espèces associées à ces infections sont *P. mirabilis* [293], *P. penneri, E. coli, Klebsiella* spp., *P. stuartii* [265, 278] mais aussi *Corynobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp, et *Ureaplasma urealyticum* [265, 278].

P. mirabilis est responsable de cystites et de pyélonéphrites aiguës parfois compliquées de lithiase [293]. Le rôle de l'uréase dans le pouvoir uropathogène de P. mirabilis a été étudié en comparant la colonisation de l'arbre urinaire de la souris par une souche sauvage et un mutant isogénique non uréolytique inoculés par voie trans-urétrale [294]. Quarante huit heures et sept jours après l'inoculation, le nombre de mutants colonisant la vessie, le rein et les urines était respectivement 100 et 1.000.000 fois plus faible que celui observé avec la souche sauvage [294] [293]. Les études histologiques réalisées au cours de ces expériences ont également montré que les lésions tissulaires étaient moins fréquentes et moins sévères au cours de l'infection par la souche mutante [293]. Ces lésions seraient la conséquence d'un effet cytotoxique des produits générés lors de l'uréolyse [295]. Des résultats analogues ont été obtenus dans un modèle d'infection expérimental chez le rat avec une souche de Staphylococcus saprophyticus et un mutant non uréolytique obtenu par mutagenèse chimique de la souche parentale [265]. L'inoculation d'urine in vitro a montré que les bactéries uréolytiques sont capables d'alcaliniser les urines contrairement aux bactéries non uréolytiques ou celles dont l'activité uréase a été bloquée par un inhibiteur spécifique [265]. Cette alcalinisation, qui est liée à la libération d'ions ammonium au cours de la dégradation de l'urée par l'uréase, précipite les cations et les anions polyvalents normalement solubles dans les urines ; il s'ensuit la formation de calculs (struvite et de carbonate apatite) [265].

Enfin, il convient de mentionner que dans le cas des bactéries uréolytiques infectant l'arbre urinaire, le mode de régulation du locus uréase et la constante d'affinité (Km) de l'enzyme pour son substrat sont adaptés à ce site anatomique : le locus uréase est transcrit chez ces bactéries de façon optimale *in vitro* lorsque la concentration d'urée du milieu environnant correspond à celle du tractus urinaire (200 à 500 mM) [250, 296] et, l'enzyme possède un Km élevé (13mM) [219].

67

#### II.3.D. Les bactéries uréolytiques responsables d'infections respiratoires

*B. bronchiseptica* [297], *Mycobacterium bovis* [298] et *A. pleuropneumoniae* [299, 300] sont toutes trois pathogènes pour les voies respiratoires de bovins et porcins et produisent une uréase. Par une approche expérimentale similaire (création d'un mutant isogénique défectueux pour la production d'uréase et mesure du pouvoir pathogène d'un aérosol bactérien chez l'animal de laboratoire) il a été démontré pour chacune de ces bactéries que l'enzyme intervient dans la colonisation bactérienne de l'arbre respiratoire. Plus particulièrement, l'uréase de *A. pleuropneumoniae* favorise la persistance bactérienne en pertubant la réponse immunitaire de l'hôte.

# **CHAPITRE III**

# LES TRANSPORTEURS DE NICKEL

Le nickel est le cofacteur d'enzymes impliquées dans la production et la consommation d'hydrogène (hydrogénase), l'hydrolyse de l'urée (uréase), l'oxydation réversible du monoxyde de carbone (CO-déhydrogénase), la méthanogenèse (méthyl-coenzyme M réductase) et la détoxication des anions superoxydes (Ni-superoxide dismutase) [301]. La capture bactérienne du nickel est requise pour la mise en œuvre de ces réactions enzymatiques. Deux groupes de transporteurs sont capables de transporter le nickel. Le premier groupe comprend les transporteurs non spécifiques, représentés principalement par les protéines Mgt et CorA qui transportent le magnésium. Le deuxième groupe inclut les transporteurs spécifiques du nickel qui sont soit un complexe protéique, soit une protéine unique. Dans la nature, la concentration en cations divalents tel que le magnésium est beaucoup plus élevée que celle du nickel. Dans ces conditions, les transporteurs non spécifiques seraient saturés par les ions magnésium et donc indisponibles pour transporter des ions Ni<sup>2+</sup>. Néanmoins, la participation de ces transporteurs dans l'incorporation du nickel n'est pas totalement exclue. Dans ce chapitre, seul les transporteurs spécifiques du nickel seront abordés.

## III.1. Les transporteurs de type ABC (<u>ATP-Binding Cassette</u>)

#### III.1.A. Le transporteur Nik de E. coli

Le chef de file d'une famille de transporteurs de type ABC a été initialement identifié chez *E. coli* lors d'une étude génétique ayant pour but la compréhension du métabolisme bactérien de l'hydrogène [302]. Dans cette étude, un mutant (dénommé initialement HydC) dépourvu d'activité hydrogénase recouvrait sa capacité à consommer l'hydrogène lorsqu'il était cultivé dans un milieu comportant une forte concentration en ions Ni<sup>2+</sup> [302]. Dans de telles conditions, les cations sont alors transportés *via* les transporteurs non spécifiques (Mgt et CorA). L'incapacité du mutant à transporter le nickel a été définitivement démontrée par la mesure de l'entrée cellulaire de nickel radioactif [303]. La caractérisation de la région d'ADN qui rétablissait l'activité hydrogénase du mutant HydC a permis d'identifier un opéron de 5 gènes : l'opéron *nik* [303]. Il code des protéines qui présentent 30 à 40% d'identité avec des transporteurs de type ABC de dipeptides et d'oligopeptides de bactéries à Gram négatif et à Gram positif [303].

Le transporteur Nik de *E. coli* est l'archétype des transporteurs de type ABC. Il est formé de deux protéines trans-membranaires, NikB et NikC ; de deux ATPases, NikD et NikE et d'une protéine périplasmique, NikA. NikB et NikC, qui sont constituées chacune de six domaines trans-membranaires, formeraient un pore nécessaire au transport des ions Ni<sup>2+</sup>. Les protéines NikD et NikE sont associées aux protéines NikB et NikC. Elles possèdent les motifs Walker A ( $GX_2GXGKS$ ) et B ( $DEX_4LD$ ) qui sont conservés dans les ATPases et qui permettent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP [303]. L'hydrolyse de l'ATP fournirait l'énergie nécessaire au transport des cations à travers la membrane cytoplasmique de la bactérie. Après son incorporation dans le périplasme, le nickel est pris en charge par la protéine NikA qui, ensuite, le véhicule et le présente aux protéines NikB et NikC.

La protéine NikA a été particulièrement étudiée. Elle possède, dans sa région aminoterminale, une séquence signal de 22 acides aminés qui est éliminée lors de la traversée membranaire de la protéine. Dans le périplasme, la protéine NikA mature se présente sous forme d'un monomère de 56 kDa [303]. Il y aurait environ 23 000 protéines NikA par cellule. Des expériences biochimiques réalisées avec la protéine NikA purifiée ont confirmé que celle-ci fixe un seul ion Ni<sup>2+</sup> (constante de dissociation < 0,1  $\mu$ M). Par ailleurs, NikA peut également fixer des ions Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, et Fe<sup>2+</sup>. Néanmoins, l'affinité de NikA pour ces cations divalents est dix fois inférieure à celle pour les ions Ni<sup>2+</sup> [304]. Des études préliminaires de cristallographie ont montré que le site de fixation du nickel de NikA comprend six à sept liaisons de coordination mettant en jeu six ligands oxygène ou azote et un ligand soufre.

#### III.1.B. Les autres transporteurs de type ABC bactériens

Les opérons de la famille Nik sont présents chez *A. pleuropneumoniae* [305], *H. hepaticus* [241], *V. parahaemolyticus* [306] et *Brucella suis* [307]. Ils ont été identifiés soit par mutagenèse par transposition, soit par séquençage de l'environnement génétique du locus uréase des bactéries. A l'exception des protéines Nik de *B. suis*, celles de *H. hepaticus*, *V. parahaemolyticus* et *A. pleuropneumoniae* présentent de faibles identités avec les protéines Nik de *E. coli* (< 40%). L'opéron de *A. pleuropneumoniae* a été dénommé *cbi* car la séquence des protéines qu'il code a une plus forte identité avec celle du transporteur de cobalt Cbi de *Haemophilus influenzae* qu'avec les protéines Nik de *E. coli* [305].

L'absence de mesure directe de l'incorporation de nickel radioactif dans les bactéries exprimant ces transporteurs ne permet pas de conclure définitivement que ces protéines participent au transport de nickel. Néanmoins, plusieurs arguments plaident en faveur d'un tel rôle pour ces protéines : leur identité avec les protéines Nik de *E. coli*, leur contribution à l'activité uréolytique des bactéries et la restauration de l'activité des métallo-enzymes à nickel chez des mutants cultivés en présence d'un excès d'ions nickel.

### III.2. Les perméases au nickel

#### III.2.A. Les protéines de la famille HoxN

La recherche d'une séquence d'ADN de *R. eutropha* restaurant l'activité d'enzymes à nickel (uréase et hydrogénase) d'un mutant de la même espèce a permis d'identifier la première perméase à nickel : HoxN [308]. Depuis, des perméases à nickel homologues à HoxN ont été reconnues chez les bactéries à Gram négatif et positif. Le transporteur NixA de *H. pylori* a été détecté en apportant chez une souche de *E. coli* (dérivée de K-12), d'une part, le locus *ure* de *H. pylori* et d'autre part, des fragments du génome de cette même bactérie [309]. Une région du génome de *H. pylori* augmentant l'activité uréolytique d'*E. coli* fût ainsi découverte : elle comprenait le gène *nixA*. De même, l'analyse des séquences d'opéron codant des métallo-enzymes à nickel et des génomes séquencés a mis en évidence des homologues de HoxN chez *Bradhyrhizobium japonicum* (HupN) [310], *M. tuberculosis* (NicT), *M. avium, Rhodococcus rhodochrous* (NhIF) [311], *Staphylococcus aureus, S. enterica* et *Y. pestis*. Le rôle des protéines NixA, NhIF et HoxN dans le transport du nickel a été démontré physiologiquement et biochimiquement. En effet, la mutation des gènes codant ces protéines

se traduit par une diminution plus ou moins prononcée de l'activité d'enzymes à nickel [309, 312, 313, 311]. De plus, les mesures d'incorporation de nickel ont démontré une réduction de l'entrée cellulaire de nickel chez ces mutants [309, 312, 313, 311].

Les études de transport de nickel radioactif ont indiqué que les protéines HoxN et NixA ont une très forte affinité pour ce cation divalent [308]. Le  $K_d$  pour le nickel est respectivement de 20nM et 11nM pour HoxN et NixA [308, 309]. Néanmoins, les valeurs obtenues sont approximatives car, d'une part le transport et d'autre part la fixation du nickel sur l'enveloppe cellulaire (LPS) est difficile à distinguer lorsque la concentration en Ni<sup>2+</sup> dans

le milieu est très faible. De plus, les cations Ni<sup>2+</sup> peuvent être transportés de façon non spécifique par les transporteurs de magnésium (Mgt ou CorA) lorsque la concentration en nickel dans le milieu est très élevée, même si de fortes concentrations en magnésium sont utilisées lors des mesures. En effet, la saturation des transporteurs Mgt ou CorA par de fortes concentrations en magnésium n'exclut pas la possibilité d'un transport du nickel par ces mêmes transporteurs.

La spécificité des transporteurs vis-à-vis des ions Ni<sup>2+</sup> est variable d'un transporteur à l'autre. Par exemple, HoxN est hautement spécifique et est incapable de transporter des cations divalents autres que les ions Ni<sup>2+</sup> [314]. En revanche, NhIF est moins spécifique puisqu'il transporte à la fois le cobalt et le nickel [314]. La spécificité de NixA pour le nickel reste hypothétique puisque le transport des autres cations autres que les ions Ni<sup>2+</sup> n'a toujours pas été étudié.

#### III.2.B. Le cas particulier du transporteur de Bacillus sp. souche TB-90

Les gènes *ureH* ou *ureI* appartenant au locus uréase de la souche TB-90 de *Bacillus* sp. coderaient un transporteur de nickel. En effet, l'activité uréolytique d'une souche de *E. coli* portant en *trans* le locus uréase de la souche TB-90 de *Bacillus* sp. est plus faible lorsque les gènes *ureH* ou *ureI* sont absents ; elle est normalisée lorsque la souche complémentée est cultivée dans un milieu contenant un excès d'ions Ni<sup>2+</sup> [243]. La fonction des protéines UreH et UreI est incomprise. UreH, qui possède seulement 15% d'identité avec les protéines de la famille HoxN, formerait le pore nécessaire au passage de l'ion à travers la membrane interne bactérienne.

# III.2.C. La topologie des perméases et motifs critiques pour le transport du nickel

La topologie membranaire des protéines HoxN et NixA a été analysée après fusion de la région amino-terminale de ces transporteurs avec la phosphatase alcaline et la  $\beta$ -galactosidase, enzymes rapportant la localisation sub-cellulaire (respectivement périplasme et cytoplasme) du segment d'intérêt [315, 316]. Ces études ont révélé que les régions amino- et carboxy-terminales des transporteurs sont situées dans le cytoplasme et que ces perméases sont constituées de huit segments trans-membranaires [315, 317]. Ces caractéristiques sont communes à tous les membres de la famille HoxN puisque les profils d'hydrophobie de ces protéines sont identiques.

L'alignement des séquences des transporteurs de la famille HoxN a révélé que les membres de cette famille partagent entre eux plus d'une cinquantaine d'acides aminés. Plus particulièrement, quatre motifs localisés dans les segments trans-membranaires caractérisent les protéines de cette famille. Ces motifs sont  $^{R}/_{K}HAXDADH^{I}/_{L}$ ,  $FXXGHS^{T}/_{S}V_{I}V$ ,  $LGX^{D}/_{E}T^{A}/S^{T}/_{S}E$ ,  $GMXXXD^{T}/_{S}XD$  situés respectivement dans les segments II, III, IV et V [316, 318]. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré qu'au moins 12 et 6 acides aminés sont essentiels au fonctionnement respectivement de NixA et de HoxN [308, 316, 318, 319]. Pour NixA, ces acides aminés sont les suivants : Asp-47, Asp-49, His-44 et His-50, situés dans le deuxième segment trans-membranaire ; Asp-55, dans le cytoplasme et après le deuxième segment trans-membranaire ; Phe-75 et His-79, dans le troisième segment trans-membranaire ; Asp-194, Thr-195 et Ser-197, dans le cinquième segment trans-membranaire ; Asp-231, dans le sixième segment trans-membranaire [316, 319]. Pour la protéine HoxN, ces acides aminés sont Asp-67 et His-62 His-68, Asn-160, Leu-173, Ile-183 [308, 318].

La divergence entre les premiers domaines trans-membranaires des protéines de la famille HoxN pourrait expliquer les différences de sélectivité de transport des cations. Le premier segment trans-membranaire de la protéine NhIF serait responsable du transport du cobalt puisque ce domaine présente une similitude avec le domaine d'un transporteur de cobalt de *Saccharomyces cerevisiae* [311] et que sa fusion avec les domaines II à VIII de HoxN permet à la protéine de fusion de transporter à la fois le nickel et le cobalt [308].

#### III.3. La régulation du transport du nickel

#### III.3.A. La régulation par l'anaérobiose

L'expression du locus *nik* de *E. coli* a été étudiée en mesurant l'activité  $\beta$ -galactosidase d'une fusion transcriptionnelle *nikA-lacZ*. La transcription du locus est induite dans des conditions d'anoxie. Elle est sous le contrôle du régulateur FNR (<u>F</u>umarate <u>N</u>itrate <u>R</u>eductase) qui régule plusieurs gènes participant à la respiration anaérobie et au métabolisme fermentaire [302]. Chez le mutant *fnr*, l'activité hydrogénase est défectueuse car il est incapable de transcrire le locus *nik* [320]. La mesure de la fluorescence relative résultant de la fusion transcriptionnelle de la région promotrice du gène *nikA* de *B. suis* avec le gène rapporteur *gfp* a montré que la transcription de l'opéron *nik* de *Brucella* est également induite par l'anoxie [307]. *In vivo*, l'induction de l'expression de l'opéron par le régulateur FNR est peu probable, même si un site putatif de fixation de FNR semble présent dans son promoteur. En effet, *B. suis* est incapable de se multiplier en anaérobiose stricte et l'existence du régulateur FNr est peu vraisemblable.

#### **III.3.B.** La régulation par le nickel

Bien qu'étant indispensable à la bactérie, le nickel est toxique lorsqu'il est présent en forte concentration dans le milieu extérieur car il peut déstabiliser les fonctions de bio-molécules en se fixant non spécifiquement sur elles, ou se substituer à d'autres métaux du site catalytique des métallo-enzymes. Deux stratégies ont été développées par E. coli pour éviter cet effet toxique. La première met en jeu un mécanisme de chimiotactisme dépendant des protéines Tar et NikA, qui assure à la bactérie la capacité de se mouvoir vers un milieu pauvre en nickel [304]. La deuxième stratégie consiste à empêcher l'entrée du nickel dans le cytoplasme de la bactérie en réprimant le locus nik [321]. Cette répression est due au régulateur NikR dont le gène a été identifié après sélection, à partir d'une souche sauvage, d'un mutant de dérégulation [321]. Le gène nikR est localisé à 5 pb en aval du gène nikE (codant l'ATPase) de l'opéron nik [321]. Des protéines homologues à NikR sont produites par plusieurs autres espèces de bactéries et d'archéobactéries [308]. Toutes les protéines NikR sont caractérisées par deux domaines : le premier, dans la région amino-terminale, comprend environ 50 acides aminés formant une structure coude-hélice-hélice, et, il serait responsable de la fixation du régulateur sur l'ADN ; le second, dans la région carboxy-terminale, est constitué d'environ 80 résidus comprenant le motif His-X<sub>13</sub>-His-X<sub>10</sub>-His-X-His-X<sub>5</sub>-Cys, et il fixerait le nickel [322]. Les études biochimiques ont établi qu'un dimère de NikR associé au nickel (un ion nickel par monomère) régule négativement l'opéron nikABCDE en s'accrochant à un opérateur formé de deux motifs nucléotidiques (5'-GTATGA-3') qui ont une orientation inversée et sont séparés de 16 pb. Une séquence homologue au site de fixation de NikR a également été identifiée en amont des gènes nikA de K. pneumoniae, nikR de H. pylori, hupN de B. japonicum et oxd-6 de S. typhimurium [323].

Des fusions, soit de la totalité de l'opéron *nik*, soit uniquement du gène *nikR* avec un gène rapporteur ont indiqué que *nikR* pourrait être transcrit à partir de deux promoteurs distincts [321]. Le premier, adjacent au gène *nikR*, est responsable d'une production de base du régulateur NikR, indépendamment de l'anoxie et de la concentration en nickel dans l'environnement bactérien [321]. Le deuxième promoteur est celui de l'opéron *nikABCDE* [321]; c'est à partir de ce dernier que NikR est régulé par le nickel.

Le modèle de régulation proposé est le suivant. Dans des conditions de croissance où le nickel est présent en faible concentration dans l'environnement bactérien, l'opéron *nikABCDE* ainsi que le gène *nikR* sont transcrits et le nickel est incorporé par la bactérie. Quand la concentration cytoplasmique de nickel augmente, NikR (dimère) fixe les ions Ni<sup>2+</sup> puis s'associe au promoteur de l'opéron *nik*. Lorsque la concentration intracellulaire de nickel diminue en dessous d'une valeur seuil, l'affinité de NikR pour son opérateur est abaissée; l'opéron *nikABCDE* est alors déréprimé et l'incorporation du nickel est de nouveau possible. Le contrôle strict de l'incorporation du nickel, qui permet à la bactérie de répondre rapidement aux ions métalliques présents dans le milieu, est réalisé grâce à la production basale et permanente de NikR à partir du promoteur de *nikR*.

# **CHAPITRE IV**

# LES TRANSPORTEURS D'UREE

L'urée est un produit du catabolisme de l'arginine qui est éliminé dans les urines des mammifères. Très largement répandue dans la nature (sol et eau), cette molécule est dégradée en acide carbonique et en ammoniaque par les microorganismes produisant une uréase. Pour les bactéries uréolytiques, les ions ammonium générés au cours de la réaction enzymatique sont une source d'azote très facilement assimilable. Ils permettent aussi aux bactéries de résister à l'acidité environnante éventuelle, par neutralisation [265]. Pour que l'urée puisse être importée dans la cellule, elle doit franchir la (ou les) membrane(s) de la cellule. Le transport de cette petite molécule peut être soit passif par diffusion simple ou facilitée, soit actif et requiert alors de l'énergie.

### IV.1. La diffusion simple

La traversée de l'urée de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes, selon un processus de solubilisation-diffusion, a été proposée il y a plus de 25 ans [324]. Initialement, le transport de l'urée a été étudié à travers des membranes artificielles [325]. Ces travaux ont montré que la valeur de la perméabilité membranaire à l'urée était faible, de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  cm/s, à une température proche de 20°C [325]. *In vivo*, cette diffusion serait encore plus faible car les stérols, éléments constitutifs des membranes, réduisent fortement la perméabilité membranaire [324, 326, 327]. Ainsi, la traversée de l'urée par un processus de diffusion simple ne permet pas une mobilisation (entrée et sortie) rapide de l'urée lors de besoins cellulaires critiques.

### IV.2. La diffusion facilitée

La diffusion facilitée de l'urée dans la cellule eucaryote a été envisagée il y a près de 30 ans par Murddaugh et co-auteurs (1964) [328]. Ce n'est que 20 années plus tard, que Levitt et Mlekoday, en étudiant le transport d'urée dans les globules rouges, ont confirmé cette hypothèse [329]. En effet, la perméabilité à l'urée des érythrocytes humains était 100 à 1000 fois supérieure à celle des membranes reconstituées *in vitro* [330].

#### IV.2.A. Les transporteurs d'urée des eucaryotes

L'augmentation de l'incorporation d'urée par des oocytes de *Xenopus laevis* ayant reçu des ARNm extraits de différents tissus animaux indique que des gènes eucaryotes spécifient des transporteurs d'urée [331]. Le premier gène facilitant l'entrée d'urée a été identifié chez le lapin ; il code une glycoprotéine de 397 acides aminés, oUT-A2 [332]. A ce jour, près d'une dizaine de transporteurs d'urée ont été isolés. Ils sont actuellement dénommés xUT-y+chiffre : x représente l'organisme à partir duquel le transporteur à été isolé ; UT signifie Urea Transporter ; y, la famille du transporteur ; le chiffre, l'isoforme de la famille [333]. Actuellement, deux familles de transporteurs, UT-A et UT-B, codées par deux gènes distincts, mais étroitement reliés, ont été identifiées. Quatre isoformes du transporteur UT-A (UT-A1 à A4) ont été individualisées ; elles résultent d'un épissage alternatif du même gène. Les transporteurs UT-A2 et UT-A3 correspondent respectivement à la moitié de la région carboxy-terminale et amino-terminale du transporteur UT-A1 [334, 335], et le transporteur UT-A4 à une fusion d'une partie de la région 5' et de la région 3' de UT-A1 [335]. Deux isoformes du transporteur UT-B (UT-B1 et UT-B2) ont été décrites. Elles diffèrent par leur région carboxy-terminale [336], l'isoforme B2 contenant des acides aminés absents dans

l'isoforme B1 [336]. Une origine commune pour ces deux isoformes est incertaine. L'alignement des séquences des différents transporteurs d'urée a mis en évidence un motif répété conservé dénommé « LP-box » (LPXXTXPF), qui est considéré comme la signature des transporteurs d'urée [337]. D'autres motifs (ATGHYNXFFP et SSPLXCLHAAIGS) ont également été proposés [333].

Les transporteurs UT-A sont localisés dans le rein avec une répartition différente des quatre isoformes au sein de cet organe [338], le colon et les testicules [335]. Le transporteur UT-B est exprimé dans les globules rouges [339], le rein et les testicules [336]. L'expression de ces transporteurs est régulée par des hormones (vasopressine et glucocorticoïdes) et par la pression osmotique [340]. Plus particulièrement, la vasopressine active la transcription du gène codant le transporteur UT-A2 et contrôle l'activité de UT-A1 par modification post-traductionnelle (phosphorylation par la protéine kinase A).

#### IV.2.B. Les transporteurs d'urée procaryotes

Chez les bactéries à Gram négatif, l'urée franchit la membrane externe *via* des porines mais aussi par diffusion simple. Le passage de ce composé à travers la membrane interne des bactéries à Gram négatif et à Gram positif est réalisé par diffusion simple mais aussi grâce au concours d'un transporteur spécifique, comme l'ont montré des travaux récents chez certains microorganismes [248].

#### Le canal à urée UreI

L'analyse de la séquence du locus uréase de *H. pylori* avait établi l'existence, en amont du gène auxiliaire *ureE*, du gène *ureI* [239]. Ce gène est également présent chez d'autres espèces de *Helicobacter* : *H. felis* [341], *H. heilemanii* [240], *H. mustelae* [245], *H. nemestrinae* [245]

et *H. hepaticus* [241]. Des gènes codant des protéines homologues à UreI sont aussi associés au locus uréase de *S. salivarius* [246] et *L. fermentum* [341], bactéries qui peuvent vivre dans un environnement acide, comme *Helicobacter*.

L'activité uréolytique de H. pylori diffère selon qu'elle est déterminée à partir de cellules lysées ou intactes : dans le premier cas de figure, l'uréolyse est plus basse à pH acide que basique ; dans le second, elle est plus basse à pH basique [245]. Ces résultats indiquaient que l'importation d'urée dans la bactérie était dépendante de la perméabilité membranaire et du pH du milieu ambiant. Des expériences menées sur des cellules perméabilisées par un détergent maintenant l'intégrité cellulaire ou sur des lysats cellulaires ont révélé que l'activité uréolytique était plus élevée dans ces conditions [247, 248]. D'autres travaux ont finalement démontré que l'augmentation de la perméabilité à l'urée de la membrane de H. pylori était contrôlée par la protéine UreI. En effet, un mutant ureI n'était pas uréolytique lorsque les cellules intactes étaient placées dans un milieu acide [248]; en revanche, l'activité enzymatique mesurée à partir d'un lysat cellulaire était identique à celle de la souche parentale [247, 248]. Enfin, en utilisant des oocytes de Xenopus dans lesquels avait été injecté un ARNm spécifiant la protéine UreI, plusieurs auteurs ont montré une augmentation de la perméabilité membranaire à l'urée de ces cellules, et à pH acide [245, 248, 342]. L'ensemble de ces données indique donc que UreI transporte l'urée et que le transporteur est activé à pH acide. L'activation de la protéine UreI de H. pylori est consécutive à une modification posttraductionnelle (cf. ci-après). Chez S. salivarius, la régulation de l'incorporation d'urée par la protéine UreI est également dépendante du pH environnant [251]. Toutefois, chez cette bactérie, l'augmentation de la perméabilité membranaire est la conséquence d'une élévation de la transcription du gène urel à pH acide et non pas d'une modification post-traductionnelle de la protéine UreI [251, 343]. Enfin, il a été démontré que UreI est un canal à urée puisqu'il assure un transport moléculaire non polarisé, indépendant de la température et de la

concentration (saturation) d'urée dans l'environnement cellulaire [248]. Lors d'un choc acide, le canal s'ouvre et permet une entrée massive d'urée dans le cytoplasme. L'urée rapidement incorporée est hydrolysée par l'uréase et les ions ammonium libérés empêchent l'acidification du milieu interne, ce qui favorise la survie de la bactérie. La fermeture du canal à pH neutre aurait pour but d'éviter une alcalinisation importante du cytoplasme qui serait létale pour la cellule.

UreI est une protéine de la membrane interne constituée de six segments transmembranaires [247, 248]. L'ouverture du canal à pH 6 suggérait qu'un processus de protonation/déprotonation des résidus histidyl présents dans les segments périplasmiques de la protéine pouvait rendre compte, en partie, de l'activation/désactivation de ce canal [248]. Des études de transport de l'urée dans les oocytes de Xenopus exprimant des protéines UreI modifiées ont démontré que les acides aminés His-123, Asp-129, His-131, Glu-138 et Asp-140 localisés dans la seconde boucle périplasmique ainsi que le résidu His-193 dans la région carboxy-terminale seraient nécessaires à l'activation du canal UreI à pH acide. Les acides aminés His-71 et His-70 situés dans la première boucle périplasmique joueraient, quant à eux, un rôle dans l'inactivation du canal à pH neutre [343]. Compte tenu de ces résultats, il était donc attendu que la substitution de ces acides aminés par d'autres résidus retentirait sur l'activité uréolytique apparente (déterminée sur cellules intactes) de H. pylori. Les expériences de mutagénèse dirigée de UreI ont montré le rôle critique du résidu His-193 et du motif LFGK (position 165 à 168) localisé dans la troisième boucle cytoplasmique [341]. En revanche, l'activité enzymatique apparente de H. pylori n'est pas influencée par la nature des résidus en position 70, 123 et 131 [341]. La divergence des résultats obtenus est probablement en rapport avec les systèmes cellulaires utilisés dans les deux études.

#### Le transporteur non spécifique GlpF

La recherche d'un gène codant une protéine participant au transport du glycérol chez *E. coli* a conduit à l'identification de la protéine de membrane interne GlpF (Glycérol Facilitator) [344]. GlpF forme un pore dans la membrane interne qui facilite le transport non seulement du glycérol mais aussi, celui de petites molécules dont l'urée [344]. Toutefois, le rôle de GlpF dans le transport de l'urée reste à préciser dans des conditions expérimentales plus physiologiques que celles jusqu'à présent réalisées. De plus, l'existence d'un tel transport chez *E. coli* qui est incapable de dégrader l'urée est encore une énigme.

### IV.3. Le transport actif

Le transport actif d'urée est un transport qui dépend d'un apport d'énergie métabolique. Ce type de transport a été mis en évidence chez certains organismes monocellulaires ainsi que dans la peau et le rein d'amphibiens [333].

#### IV.3.A. Le transport d'urée chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, le transport actif de l'urée permet de maintenir l'équilibre osmotique lorsque l'hydratation de l'organisme est insuffisante [345]. En effet, les travaux réalisés sur la peau d'amphibiens ont montré que l'entrée de l'urée est plus importante que sa sortie et que l'incorporation de la molécule est d'autant plus élevée que les animaux sont déshydratés [345]. Ce transport de l'urée est un transport actif secondaire mettant en jeu des protons puisqu'il est d'une part influencé par le pH de l'épithélium cutanée et, d'autre part, inhibé par des inhibiteurs d'ATPase à protons [346]. Néanmoins, un transport de l'urée par un

mécanisme de transport primaire (urée-ATPase) et dépendant du pH n'est pas exclu [347]. Actuellement, aucun transporteur supportant ce type d'entrée de l'urée n'a été caractérisé chez les eucaryotes supérieurs.

L'inhibition de l'accumulation de l'urée chez Saccharomyces cerevisiae par des inhibiteurs du métabolisme énergétique et par des agents découplants indiquait l'existence d'un transport actif d'urée chez la levure [348]. La recherche d'une séquence d'ADN restaurant l'accumulation d'urée chez un mutant incapable de transporter l'urée a conduit à l'identification du gène *DUR3* qui code une protéine trans-membranaire formée de 735 acides aminés [348]. Le mécanisme du couplage énergétique de l'entrée active d'urée chez *S. cerevisiae* reste inconnu.

#### IV.3.B. Le transporteur Fmd de Methylophilus methylotrophus

L'existence d'un transport actif d'urée a été constatée chez K. pneumoniae, R. eutropha [349], B. megatherium [350], P. aeruginosa [351, 352] et Methylophilus methylotrophus [353]. Seul le transporteur d'urée de cette dernière bactérie a été identifié à ce jour [353].

*M. methylotrophus* est capable de dégrader le formamide et l'acétamide grâce à des enzymes cytoplasmiques : la formamidase et l'acétamidase. La formamidase est codée et régulée par l'opéron *fmdABC*. Le gène *fmdA* code l'enzyme, *fmdB*, un régulateur activant *fmdA* en présence d'urée ou de formamide et, *fmdC* une porine de la membrane externe permettant le transport d'amides à courte chaîne et d'urée [353]. Trois autres gènes *fmdD*, *fmdE* et *fmdF* qui sont situés a proximité de l'opéron *fmdABC*, spécifient des protéines qui participent également, de concert avec FmdC, au transport actif d'amides à courte chaîne et d'urée [353]. Le modèle de transport proposé par Mills et co-auteurs suppose que l'urée et les autres amides à courte chaîne du milieu extérieur traversent la membrane externe grâce à la

porine FmdC [353]. Les molécules seraient ensuite prises en charge par la protéine périplasmique FmD qui les apporterait au complexe protéique FmdE-FmdF formant le transporteur de la membrane interne. Le processus énergétique nécessaire à ce transport n'a pas encore été déterminé. Néanmoins, la ressemblance de ce transporteur avec ceux de type ABC des bactéries à Gram négatif laisse penser que ce transport nécessiterait des ATPases cytoplasmiques associées aux protéines membranaires FmdE et FmdF. Ces ATPases fourniraient l'énergie nécessaire à la translocation des amides dans le cytoplasme.

# **Travaux personnels**

A l'initiation de mes études doctorales, la connaissance des gènes impliqués dans la capacité des *Yersinia* à dégrader l'urée était relativement limitée. Seuls avaient été identifiés les gènes de biogenèse (gènes de structure et gènes auxiliaires) de l'uréase des deux espèces entéropathogènes, d'abord ceux de *Y. enterocolitica* puis, ceux de *Y. pseudotuberculosis*. Par ailleurs, l'existence d'un locus *ure* (sans pour autant séquencé) chez *Y. pestis*, bactérie dépourvue d'activité uréolytique avait été établi.

Mes recherches ont eu pour objet de :

- comprendre l'absence d'expression du locus *ure* chez *Y. pestis*.
- caractériser l'environnement génétique du locus *ure* chez les trois espèces pathogènes de *Yersinia*;

Les résultats de mes investigations sont présentés sous le format de trois articles :

1) Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene.

2) Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic *yersiniae*.

3) The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionnaly interchangeable *in vitro* with the *Helicobacter pylori* UreI protein.

Les données qui y sont rapportées sont commentées dans le dernier chapitre du mémoire.

Publication n°1

## Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene

Sebbane, F. Devalckenaere, A. Foulon, J. Carniel, E. and Simonet, M.

Infection and Immunity (2001), 69 (1), 170-176

#### Silencing and Reactivation of Urease in Yersinia pestis Is Determined by One G Residue at a Specific Position in the *ureD* Gene

FLORENT SEBBANE,<sup>1</sup> ANNIE DEVALCKENAERE,<sup>1</sup> JEANNINE FOULON,<sup>2</sup> ELISABETH CARNIEL,<sup>2</sup> and MICHEL SIMONET<sup>1</sup>\*

Equipe Inserm E9919-Université JE2225, Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Institut de Biologie de Lille, 59021 Lille,<sup>1</sup> and Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, Laboratoire des Yersinia, Institut Pasteur, 75724, Paris,<sup>2</sup> France

Received 5 July 2000/Returned for modification 1 August 2000/Accepted 21 September 2000

Yersinia pestis, the plague agent, is a naturally nonureolytic microorganism, while all other Yersinia species display a potent urease activity. In this report we demonstrate that Y. pestis harbors a complete urease locus composed of three structural (ureABC) and four accessory (ureEFGD) genes. Absence of ureolytic activity is due to the presence of one additional G residue in a poly(G) stretch, which introduces a premature stop codon in ureD. The presence of the same additional G in eight other Y. pestis isolates indicates that this mutation is species specific. Spontaneous excision of the extra G occurs at a frequency of  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  and restores a ureolytic phenotype to Y. pestis. The virulence of two independent ureolytic clones of Y. pestis injected either intravenously, subcutaneously, or intragastrically did not differ from that of the parental strain in the mouse infection model. Coinfection experiments with an equal number of ureolytic and nonureolytic bacteria did not evidence any difference in the ability of the two variants to multiply in vivo and to cause a lethal infection. Altogether our results demonstrate that variation of one extra G residue in ureD determines the ureolytic activity of Y. pestis but does not affect its virulence for mice or its ability to multiply and disseminate.

Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis are gram-negative bacteria pathogenic for animals and humans. The former is transmitted by fleas and is responsible for plague, a fatal systemic infectious disease, whereas the latter causes a selflimiting mesenteric lymphadenitis and is transmitted by the oral route (10). Although Y. pestis and Y. pseudotuberculosis have distinct cycles of transmission and induce infection with different clinical manifestations, they are genetically closely related, with a DNA relatedness superior to 90% as determined by DNA-DNA hybridization (4). Sequence comparisons of homologous genes from both microorganisms revealed nucleotide identities ranging from 97 to 99% (1, 9, 28, 32, 33, 35, 36, 39, 40), and recent results suggest that Y. pestis is a clone of Y. pseudotuberculosis that emerged less than 20,000 years ago (1). Strikingly, several genes present in both species are intact in Y. pseudotuberculosis but mutated in Y. pestis. These include the virulence-associated plasmid (pYV)-borne gene yadA and the chromosomal invasion genes inv and ail. Nonexpression of yadA is due to a frameshift mutation in its coding sequence (33), while inactivation of inv and ail results from the disruption of their open reading frames by insertion sequences IS1541 (35) and IS285 (S. D. Torosian and R. M. Zsigray, Abstr. 96th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1996, abstr. B-213, 1996), respectively. Furthermore, several phenotypic properties such as motility at 28°C; synthesis of a complete LPS molecule; and ability to ferment rhamnose and melibiose, to

\* Corresponding author. Mailing address: Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses et Parasitaires, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France. Phone: 33 3 20 87 11 78. Fax: 33 3 20 87 11 83. E-mail: michel.simonet @ibl.fr. synthesize some amino acids (methionine, phenylalanine, threonine-glycine, and isoleucine-valine), and to degrade urea are expressed in *Y. pseudotuberculosis* but not in *Y. pestis* (reviewed in references 6 and 27).

We have recently characterized the chromosomal *ure* locus of the ureolytic species *Y. pseudotuberculosis* (30). This locus is composed of three structural genes (*ureA*, *ureB*, and *ureC*) and four accessory genes (*ureE*, *ureF*, *ureG*, and *ureD*) which are most likely organized in a polycistronic unit. Although *Y. pestis* is urease negative, hybridizations with *ure* probes from *Y. enterocolitica* suggested that a *ure* locus is also present in this species (15), but the reasons for the absence of urease activity in *Y. pestis* have never been elucidated. The aim of the present work was to investigate the molecular bases for the silencing of the *ure* locus of *Y. pestis* and to evaluate the impact of this natural mutation on the virulence and in vivo multiplication of the microorganism.

#### MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The main characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Yersinia* strains were grown at 28°C and *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  was grown at 37°C, in Luria-Bertani broth or on agar plates. Ampicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup>; kanamycin, 50 µg ml<sup>-1</sup>; and nalidixic acid, 50 µg ml<sup>-1</sup>, were used for bacterial selection. Characterization of *Yersinia* strains was achieved with API 20E and API 50CH strips (bioMérieux). Detection of urease activity was performed on urea segregation agar as described previously (30) or in urea-indole medium (Diagnostics Pasteur). The pigmentation (Pgm) phenotype of *Y. pestis* was determined on Congo red agar plates after 4 days of growth (37).

Nucleic acid manipulations. Extraction of genomic DNA and small-scale isolation of plasmid DNA were done as previously described (5, 8, 16). Large-scale plasmid DNA preparations were purified on columns in accordance with the manufacturer's recommendations (Qiagen GmbH). Genomic or plasmid DNA was digested with the appropriate restriction endonuclease purchased from GIBCO BRL or Promega, and the resulting fragments were separated by elec-

Vol. 69, 2001

Strain or plasmid	Relevant property(ies)"	
Strains		
Y. pestis		
6/69	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Orientalis, ribotype B	19
6/69c	pYV-cured derivative of wild-type strain 6/69	35
6/69c U.1, U.2, U.3 and U.4	Ure <sup>+</sup> derivatives of strain 6/69c	This work
6/69 U2.1 and U5.1	Ure <sup>+</sup> derivatives of strain 6/69	This work
6/69r	Spontaneous Nal <sup>r</sup> mutant of strain 6/69	This work
EV76	Vaccine strain	17
EV76U	Ure <sup>+</sup> derivative of strain EV76	This work
PKR XXV	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Medievalis, ribotype O	19
Saïgon 55-1239	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Orientalis, ribotype E	19
Senegal Th	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Orientalis, ribotype B	19
Kenya Mi	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Antigua, ribotype F	19
Congo Belge 343	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Antigua, ribotype N	19
Kenya Ro	Wild-type (Ure <sup>-</sup> ), biotype Antiqua, ribotype M	19
Y. pseudotuberculosis IP32777c	pYV-cured derivative of wild-type strain IP32777 (Ure <sup>+</sup> ); serotype I	30
E. coli DH5α	supE $\Delta lacU169$ ( $\varphi 80$ lac Z $\Delta M15$ ) hsdR recA endA gyrA hri relA	Gibco BRL
Plasmids		
pUC18	Cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Appligene
pZFrO-21	Cloning vector, Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pKK 388-1	Expression vector: $oriR$ nBR322, IPTG-inducible promoter P. Apr and Tcr	Clontech
nATT113	Derivative of pATT112 (arig pACYC184: Km <sup>2</sup> ) with $lacZ\alpha$ and MCS of cloning	38
printing	vector pUC19	
pBRU	Derivative of pBR325 containing a 7.3-kb <i>HindIII/PstI</i> fragment from <i>Y</i> . <i>pseudotuberculosis</i> IP32777 DNA encompassing the <i>ure</i> locus and its promoter region	30
pFS97	Derivative of pUC18 containing a 7.3-kb <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I fragment from <i>Y. pestis</i> 6/69 DNA encompassing the <i>we</i> locus and its promoter region	This work
pFS98	Derivative of pAT113 containing the <i>ure</i> locus and its promoter region from Y. <i>pseudotuberculosis</i> IP32777c	This work
pFS99	Derivative of pKK388-1 containing ureD from ureolytic strain 6/69c U.1	This work

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

"Abbreviations: Apr, Kmr, and Nalr, resistance to ampicillin, kanamycin, and nalidixic acid, respectively; MCS, multiple cloning site; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside.

trophoresis on 0.8 to 1.2% agarose gels and transferred onto Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham) by the Southern technique. Elution of restriction fragments from agarose gels was carried out with the Qia quick gel extraction kit (Qiagen GmbH). Pulsed-field gel electrophoresis of macrorestricted DNA fragments from *Y. pestis* was resolved as previously described (9). Total RNAs were extracted from exponentially growing *Yersinia* cells with the High Pure RNA isolation kit (Boehringer Mannheim) following the manufacturer's instructions. For dot blot analysis, 15 µg of RNA was spotted onto Hybond-N<sup>+</sup> membrane.

DNA fragments were ligated to endonuclease-restricted vectors according to standard techniques with T4 DNA ligase (GIBCO BRL). Recombinant plasmid DNAs were introduced by transformation into *E. coli* (34) or into *Yersinia* by electroporation (12).

Prehybridization, hybridization under stringent conditions of membrane-blotted DNA or RNA with digoxigenin-labeled DNA probe, and detection of nucleic acid hybrids were performed with the DIG hybridization and detection kit from Boehringer Mannheim.

Nucleotide sequence determination was performed by the dideoxy chain termination method, using the ABI PRISM dichloRhodamine Dye Terminator Sequencing kit with Amplitaq DNA polymerase FS (Perkin-Elmer), according to the manufacturer's instructions. Extension products were analyzed with the Applied Biosystems model ABI 373 automated DNA sequencing (Perkin-Elmer). The nucleotide sequences were analyzed with Perkin-Elmer softwares (Sequence Analysis and Sequence). Multiple protein alignment was carried out with the CLUSTAL\_X program.

**PCRs.** PCR amplification was performed in a 100- $\mu$ l reaction volume with a model 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus). Fifty nanograms of target DNA, a 200 mM concentration of each deoxynucleoside triphosphate, 0.1 nmol of each primer, and 1 U of thermostable DNA polymerase were mixed in the

corresponding  $1 \times$  polymerase buffer. Amplification involved 30 cycles, each consisting of (i) a denaturation step of 1 min at 94°C, (ii) an annealing step of 1 min at 55°C, and (iii) a polymerization step of 1 min at 72°C. Digoxigenin-labeled PCR products were generated using PCR DIG labeling mix from Bochringer Mannheim. Amplimers were purified on SpinX columns (Corning Costar Corporation).

Oligonucleotide primers. Forty oligomers encompassing the ure locus (and its promoter region) from Y. pseudotuberculosis (GenBank accession number U40842) were synthesized by Genset and Oligo-Express. Forward (f) and reverse (r) primers and their nucleotide sequences (5' to 3') were as follows: 1f, AAT GCTGCGTCAGATTGG: 2f. ACCTAATGTACAGGAGGAT; 3f. TTTTACC GATGGCAGCCGTCT; 4f, GTTAACCGCGCACTGG; 5f, GGCAAGAATA CGCGGGTCTA; 6f, GGATGGCACTAACGGGACA; 7f, ATGCGTTCGAA GGTCGCA; 8f, GCGTTATCTCCATGTTCTC; 9f, CAATGTTTGGCGCG AT; 10f, GCTAATCTGAGGTAGCAG; 11f, GGTCTGGATCTGGGCATTT CT; 12f, CGAGGTGTATGTGCCTCTGA; 13f, CATGGTGATCACGATCAT GAC; 14f, AATCTGCCATTCAAACCGGC; 15f, AGCTGGCAGAAATGTC GAT; 16f, GATCGCGTTACGCATTTC; 17f, ATTGGTATTGGTGGTCCGG; 18f, GCCGACATTTTAGTGATC; 19f, GAGTTACCTTGTGTCACC; 20f, ACTGATACCACGATCA; 21f, CGCCCAAAGAACAT; 22f, GATGCGCCA TTTTAA; 1r, CTGCAGCGGTATTCGCTGCTC; 2r, GGGCTATCTTCCAAA AT; 3r, GTAATAAAACGGGAA; 4r, TAATGCGTGAGCGCGAA; 5r, AAT GTTCATGCTCGGG; 6r, CCTTGTGCTGCCATAAC; 7r, GCCGGTTTGAA TGGCAGATT; 8r, GTCATGATCGTGATCACCATG; 9r, GAAATGCCCAG ATCCAGACC; 10r, ATAGCGCTGATTCATCGACG; 11r, CATCGCGCCAA ACATTG; 12r, CATGGAGATAACGCCCATA; 13r, TGCGACCTTCGAAC GCAT; 14r, TGTCCCGTTAGTGCCATCC; 15r, CAGATTATTGTTGGCCC CC; 16r, TAAAACCACGCTCGGCGGCAA; 17r, TCCAGTGCGCGGTTAA



FIG. 1. Nucleotide and derived amino acid sequences of the 3' end of *ureD* in Y. *pestis* (Yp) and Y. *pseudotuberculosis* (Ypst). An extra G residue (the G-rich region is shown in the black box) in the Y. *pestis* gene results in a frameshift mutation which creates a premature stop codon (TAA).

CC; 18r, AGACGGCTGCCATCGGTAAAA; 19r, TCAGACAGCGTGTAGA TC; 20r, CATCCTCCTGTACATTTAGGT. Primers Af (AAGTTCGAAATA AGGAGGTTTAAACCATGACAGCACAGAGCCAGAAT) and Ar (CGGTC TAGATCAGCGCCACAAAAATTGTTC) were also used in this work. Nucleotides (nt) 4 to 26 of primer Af included a *Csp*451 restriction site followed by nt 315 to 331 from vector pKK388-1, and the last 21 nt corresponded to the 5' end of Y. pestis ureD. Primer Ar corresponded to the 3' end of Y. pestis ureD with a Xbal recognition site linker.

**Experimental infections.** Five-week-old, OF1 female mice (Iffa Credo) were used. For 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) determinations, serial dilutions of bacterial suspensions in saline were inoculated intragastrically (i.g.) (0.2 ml) via a gastric tube, intravenously (i.v.) (0.5 ml), or subcutaneously (s.c.) (0.1 ml) to groups of five animals. For gastric inoculation, mice were first starved for 18 h. Infected animals were monitored for 3 weeks, and the LD<sub>50</sub>s were calculated according to the method of Reed and Muench (29).

To perform coinfection experiments, groups of 15 to 20 animals were challenged s.c. with approximately the same number of bacteria of each phenotype. Moribund mice were sacrificed, and their blood and spleen were removed aseptically. The spleens of freshly dead (less than 1 h) animals were also collected. Serial dilutions of the biological samples were plated in duplicate on Luria-Bertani-hemin agar plates with and without nalidixic acid. The number of bacteria grown in the presence or absence of the antibiotic was recorded. A more precise determination of the proportion of the two bacterial populations was obtained by spotting 100 colonies from the most appropriate dilutions onto plates with and without nalidixic acid. The association between urease activity and nalidixic acid resistance or susceptibility was subsequently checked on Nal<sup>e</sup> and Nal<sup>e</sup> colonies.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data has been deposited in the GenBank nucleotide sequence database under accession number AF095636.

#### RESULTS

Nonexpression of the *ure* locus of *Y. pestis* does not result from transcriptional regulation or alteration of the promoter region. Since previous results suggested that *Y. pestis* possesses a *ure* locus (15), a possible explanation for its nonexpression was the absence of a positive regulator required for its activation, or the presence of a repressor that prevents its transcription. In both cases, introduction into *Y. pestis* of the functional *ure* locus of *Y. pseudotuberculosis* should not confer a urease activity on the recipient strain. To test this hypothesis, a 7.3-kb *Hind*III/*Pst*I DNA fragment encompassing the entire *ure* locus of *Y. pseudotuberculosis* and its promoter region (30) was cloned into the low-copy-number vector pATT113 (Km<sup>r</sup>) to yield the recombinant plasmid pFS98, which was subsequently introduced by electroporation into Y. pestis strain 6/69c. Transformants able to grow on kanamycin agar plates were tested for their ability to degrade urea in urea broth. *trans*-complemented clones were able to hydrolyze urea, thus suggesting that nonexpression of the *ure* locus of Y. pestis is not driven by a regulatory mechanism.

To confirm this hypothesis and to determine whether the promoter region upstream of *ureA* was functional in *Y. pestis*, a slot blot analysis was carried out on total RNAs extracted from an exponentially growing culture of strain 6/69c. *ureABC* and *ureEF* DNA probes from *Y. pseudotuberculosis* hybridized with *Y. pestis* RNA extracts but not with the RNase treated-preparation (not shown) demonstrating that the *ure* locus of *Y. pestis* is transcribed.

Therefore, the inability of *Y. pestis* to hydrolyze urea is due neither to a defect in transcriptional regulation nor to an alteration of the promoter region of the *ure* locus.

The sequences of the *ure* loci of Y. pestis and Y. pseudotuberculosis are highly similar, but the *ureD* gene of Y. pestis is disrupted. Cloning and sequencing of the complete *ure* locus of Y. pestis 6/69c (GenBank accession number AF095636) was performed to further investigate the differences with the *ure* locus of Y. pseudotuberculosis IP32777 (GenBank accession number U40842). The genetic organization of the *ure* locus of Y. pestis was identical to that of Y. pseudotuberculosis with the seven genes *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, and *ureD* in the same order and polarity (Fig. 1).

The sequence of the ~0.8-kb region upstream of *ureA* and encompassing the promoter was identical in the two species. The structural genes *ureA*, *ureB* and *ureC* were highly conserved (99.6% nucleotide identity) in both species, and their putative products had identical amino acid sequences, except for UreC in which a Ser<sub>175</sub> in *Y. pseudotuberculosis* was replaced by a Thr<sub>175</sub> in *Y. pseusory* genes *ureE*, *ureF*, *ureG*, and *ureD* were also highly identical (98.6% nucleotide identity) in the two species. The amino acid sequence of the *Y. pseudotuberculosis* by only 1 amino acid (aa), i.e., the presence of a Glu<sub>206</sub> instead of a Gly<sub>206</sub>. Similarly, only two residues differentiated the UreF proteins of the two species: a Vol. 69, 2001

Val<sub>64</sub> and a Met<sub>70</sub> in Y. pestis replaced an Ala<sub>64</sub> and a Val<sub>70</sub>, respectively, in Y. pseudotuberculosis. The UreG proteins were identical in the two bacteria. The major difference observed between the two species lay in ureD, the last gene of the ure locus. This gene had the capacity to code for a predicted product of 277 aa in Y. pestis instead of the 321-residue-long protein in Y. pseudotuberculosis, due to a premature stop codon in the Y. pestis ureD sequence (Fig. 1). This stop codon was generated by a frameshift caused by the presence of an additional guanine (G) residue in a seven-G stretch in the Y. pestis ureD coding sequence. The same additional G was also identified in eight other strains of Y. pestis of various geographical origins and biotypes (Table 1), as well in strains CO92 (biotype Orientalis) and KIM5 (biotype Medievalis) whose genome sequence is available online from the Sanger Centre (http:// www.sanger.ac.uk/Projects/Y\_pestis/blastserver.shtml) and the University of Wisconsin-Madison Genome Project (http:// www.magpie.genome.wisc.edu/cgi-bin/Authenticate.cgi/uwgp \_blast.html). The chromosomal fragment flanking the 3' end of the ure locus differed in the two species by a stretch of 178 bp, present only in Y. pseudotuberculosis.

Therefore, our data indicate that the *ure* loci of Y. *pestis* and Y. *pseudotuberculosis* are highly conserved at the nucleotide and amino acid level, except for the 3' end of this locus where the *ureD* gene of Y. *pestis* is truncated. The absence of a functional chaperone-like protein UreD, essential for the assembly of the urease structural subunits (24), could therefore be responsible for the inability of Y. *pestis* to degrade urea.

The region encompassing the ure locus is conserved in Y. pestis. The conservation of the region encompassing the ure locus was studied in eight additional isolates of Y. pestis with different biotypes and ribotypes (Table 1). The entire ure locus and promoter region of these strains were amplified by PCR using four sets of primers defined on the basis of the ure sequences of Y. pestis 6/69c. For all strains tested, primer sets 1 (1f and 15r), 2 (6f and 1r), 3 (11f and 7r), and 4 (15f and 2r) yielded PCR products with sizes identical to those of strain 6/69c, i.e., 2.2, 2.1, 1.0, and 2.4 kb, respectively. Digestion of these amplimers with either HaeIII or MboI (two endonucleases that have several restriction sites in the ure locus) generated restriction fragments exhibiting electrophoretic patterns identical to those of strain 6/69c (not shown). Furthermore, comparisons of the nucleotide sequence of the ure locus of strain 6/69c with that of strain CO92 (per the Sanger Centre website) showed only one difference, at position 4561 in ureF, resulting in the replacement of a  $Met_{70}$  in 6/69c by a  $Val_{70}$  in CO92.

Thus, the chromosomal region encompassing the *ure* locus appears to be well conserved in different strains of *Y. pestis.* 

Spontaneous ureolytic mutants of Y. pestis 6/69c arise by a single nucleotide deletion in the accessory gene *ureD*. Brubaker and Sulen (7) previously reported the occurrence of urease-positive mutants in laboratory strains of Y. pestis. This observation suggested that the silent *ure* locus of Y. pestis could be reactivated under certain circumstances. By cultivating strain 6/69c on urea agar, we were able to obtain ureolytic colonies at high frequencies  $(10^{-4} \text{ to } 10^{-5})$ . These colonies had a particular morphology on urea agar plates, characterized by an irregular and enlarged shape. This unusual aspect of the colonies was subsequently lost upon storage, although the or-

TABLE 2. Virulence of ureolytic and nonureolytic strains of *Y*. *pestis* 

Strain	Phenotype	LD <sub>50</sub> for mouse infected via:		
		s.c. route"	i.v. route"	i.g. route <sup>b</sup>
6/69	Ure <sup>-</sup>	<101	<101	$10^{6.7 \pm 0.3}$
6/69 U5.1	Ure <sup>+</sup>	<101	<101	$10^{7.2 \pm 0.2}$
6/69 U2.1	Ure <sup>+</sup>	$< 10^{1}$	$< 10^{1}$	$10^{7.5 \pm 0.7}$

" Results are mean values of two separate assays.

<sup>b</sup> Results are mean values  $\pm$  standard deviations of three separate assays.

ganisms retained their ureolytic activity. To investigate the molecular bases for this shift to urease activity in the 6/69c mutants, the nucleotide sequence of the entire ure locus and promoter region from one ureolytic mutant (6/69c U.1) was determined. Over the 6,961-nt region sequenced, only one difference was observed between the wild-type strain and its isogenic derivative, and this difference corresponded to the deletion of the additional G in the G-rich region of ureD. Absence of this G residue restored an intact *ureD* open reading frame (ORF) having the capacity to code for a complete 321-aa protein whose sequence was identical to that of Y. pseudotuberculosis with the exception of one substitution of an Arg for a Cys at position 58. Demonstration that the extra G was responsible for the silencing of the ure locus in Y. pestis and therefore that the C terminus of UreD was crucial for urease activity was obtained by *trans*-complementing wild-type strain 6/69c with plasmid pFS99, which contains the functional ureD gene of the ureolytic clone 6/69c U.1. The trans-complemented colonies acquired the ability to hydrolyze urea.

Three other spontaneous ureolytic clones of strain 6/69c (6/69c U.2, U.3, and U.4) obtained from independent experiments exhibited the same deletion of the extra G in *ureD*. Similarly, ureolytic clones obtained from another strain of Y. *pestis* (strain EV76) exhibited the same mutation in *ureD*. Altogether, our data demonstrate that the absence of urease activity in Y. *pestis* is due to the insertion of a G residue in the *ureD* locus and that high-frequency deletion of this additional G results in a shift to a ureolytic phenotype.

Switch to a ureolytic phenotype does not modify the pathogenicity of Y. pestis in the mouse experimental model. The impact of urease activity on bacterial pathogenicity was assessed in the mouse experimental model of infection. Ureolytic clones of the fully virulent wild-type strain 6/69 (pYV<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>, pFra<sup>+</sup>, Pgm<sup>+</sup>) were selected on urea agar as described above. Since genomic rearrangements occur at high frequencies in Y. pestis (19), the presence of the three resident plasmids, the colony pigmentation on Congo red agar plates, and the NotIand SpeI-restriction profiles of the ureolytic mutants were checked before performing virulence assays. Two independent ureolytic mutants, designated 6/69 U2.1 and 6/69 U5.1, were selected; sequencing of the *ureD* gene in both strains showed, as expected, that it contained six G residues in the G-rich region. Strains 6/69 U2.1 and 6/69 U5.1 were injected i.v. and s.c. into mice. As illustrated in Table 2, the LD<sub>50</sub> for mice of the two mutants injected either by the s.c. or the i.v. route was similar to that of the wild-type strain. No difference in the kinetics of killing was noted between animals inoculated with ureolytic and nonureolytic strains (not shown).



FIG. 2. Percentages of  $Ure^+$  and  $Ure^-$  *Y. pestis* cells recovered from the spleen of individual mice. OF1 mice were infected s.c. with an equal number of  $Ure^-$  (strain 6/69r) and  $Ure^+$  (strain 6/69 U5.1) *Y. pestis* cells. Two separate experiments were performed with a bacterial inoculum of 115 and 85 bacteria per animal, respectively. The percentage of  $Ure^+$  (black columns) and  $Ure^-$  (grey columns) bacteria in spleens of moribund animals was determined as described in Materials and Methods. Results obtained for each individual mouse are presented.

To determine whether in vivo growth of ureolytic Y. pestis could lead to the reversion to a nonureolytic state, bacteria were recovered from the blood and spleen of moribund mice infected with ureolytic strains 6/69 U2.1 and 6/69 U5.1. Upon isolation from these animals, all bacterial colonies tested were ureolytic, indicating that no silencing of the urease locus was induced in vivo. Similarly, all colonies harvested from animals infected with the wild-type Y. pestis 6/69 remained nonureolytic.

Urease has been shown to be important for Y. enterocolitica survival during passage through the acidic environment of the stomach (14, 18). Since Y. pestis is not commonly transmitted by the oral route, absence of a urease activity may not affect its dissemination from the site of the flea bite. However, this mutation may have an effect when the bacteria are administered orally. This hypothesis was tested by determining the  $LD_{50}$  of wild-type Y. pestis and of the two ureolytic derivatives in mice infected i.g. No statistically (Student's t test) significant difference in  $LD_{50}$  was observed between the wild-type strain and the two ureolytic derivatives by this route of infection. Therefore, our results indicate that expression or nonexpression of the *ure* locus does not affect the  $LD_{50}$  of Y. pestis in the mouse model, whatever the route of infection.

The ability of the ureolytic and nonureolytic clones to disseminate in vivo and to cause an infection was further compared by coinfecting mice with an equal number of Ure<sup>-</sup>  $(6/69r, Nal^r)$  and Ure<sup>+</sup>  $(6/69 \text{ U5.1}, Nal^s)$  cells. Animals were challenged s.c. with approximately 50 bacteria of each phenotype. The proportion of Ure<sup>+</sup> and Ure<sup>-</sup> clones recovered from the infected animals was determined on agar plates with and without nalidixic acid. The results of two independent experiments are presented in Fig. 2. The proportions of Ure<sup>+</sup> and Ure<sup>-</sup> colonies recovered from their spleen ranged from 0 to 100%. Of the 14 mice analyzed, one died with an equal amount of Ure<sup>+</sup> and Ure<sup>-</sup> strains while the 13 remaining animals were predominantly infected with either the  $\text{Ure}^+$  (7 of 13) or the  $\text{Ure}^-$  (6 of 13) variant. The fact that the number of animals massively infected with ureolytic or nonureolytic bacteria did not differ significantly (chi-square test) indicates no selective advantage of one variant over the other and suggests that infection resulted from the random expansion of either a  $\text{Ure}^+$  or  $\text{Ure}^-$  clone in vivo. The proportion of  $\text{Ure}^+$  and  $\text{Ure}^-$  colonies recovered from the blood of the infected animals correlated perfectly with that found in their spleen (data not shown).

Altogether, our data indicate that a switch to a ureolytic phenotype does not modify the virulence of *Y*. *pestis* for mice or its ability to multiply and disseminate in vivo.

#### DISCUSSION

Bacterial ureases are commonly composed of three subunits, UreA, UreB, and UreC, which assemble to form a multimeric complex, (UreABC)<sub>3</sub>. Activation of the apoenzyme requires the presence of nickel ion, carbon dioxide, and auxiliary proteins UreD, UreF, UreG, and UreE (24). During the initial step of activation, UreD, a chaperone-like protein, is thought to form a complex with the apoenzyme, essential for the assembly of the urease structural subunits. UreF and UreG then associate with the complex, allowing the apoenzyme to accept nickel ions within the enzymatic catalytic site of the structural subunit UreC. These proteins may function in delivering the carbon dioxide molecule that reacts with the apoprotein to become a nickel ligand. Alternatively, UreF and/or UreG may facilitate interaction between the urease apoprotein and the nickel donor, UreE. Upon activation, all these accessory proteins dissociate from the enzyme and are recycled (24). In this study, we showed that the inability of Y. pestis to hydrolyze urea results from nonactivation of the urease complex, due to truncation of the accessory protein UreD. Introduction of a funcVol. 69, 2001

tional *ureD* gene from a ureolytic mutant confers on the wildtype strain the capacity to degrade urea.

The ureolytic phenotype depends on the number of G residues in a stretch of G located between nt 6624 and 6630 in *ureD*. When the number of bases in this poly(G) tract is seven, Y. pestis synthesizes a truncated UreD protein and is unable to degrade urea (phase off). When this number is six, the microorganism produces a complete protein and is capable of hydrolyzing urea (phase on). Phase-on variants, detected by growing Y. pestis on urea agar, were obtained at a high frequency  $(10^{-4} \text{ to } 10^{-5} \text{ cell})$ . The frequency of reversion to the nonureolytic phase could not be determined on this medium because urease-negative revertants cannot be identified among a high number of ureolytic colonies. However, the fact that some fresh clinical isolates of Y. pestis had the capacity to degrade urea upon isolation and rapidly lose this property upon storage or subculture (26) argues for an on-to-off switch. Such phase variations due to an alteration in a stretch of polymononucleotides within a translating reading frame have already been described for several genes, mainly pathogenicity ones, including genes from Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Bordetella pertussis, Vibrio cholerae, Mycoplasma pneumoniae, and Helicobacter pylori (2, 20, 22). These repeats, mostly composed of 6 to 15 polypurines or polypyrimidines, represent a hot spot for DNA replication errors caused by slipped-strand mispairing (20, 31). This process is thought to involve a triple-stranded DNA (H-DNA) conformation of the repetitive region which interacts with the DNA replication machinery, and stability or ease of formation of the H-DNA structure is dependent on the length of the repeat (21). In the case of the *ureD* gene of Y. pestis, the poly(G) tract is composed of only six or seven bases, a number which might be quite short for the latter mechanism to take place.

Production of urease contributes to the pathogenicity of some microorganisms. This is well established for the human gastric pathogen Helicobacter pylori in which inactivation of urease abrogates its capacity to colonize the stomach (24). Since Y. pestis has acquired, during evolution, the ability to be transmitted by fleas, it is not surprising that genes facilitating its oral transmission have been subsequently lost. This may also explain the absence of difference in virulence or in vivo multiplication and dissemination observed between ureolytic and nonureolytic clones of Y. pestis injected i.v. or s.c. However, the  $LD_{50}$ s for Ure<sup>+</sup> and Ure<sup>-</sup> cells inoculated i.g. were also of the same magnitude, indicating that urease does not contribute to acid resistance of Y. pestis in the stomach. This observation corroborates a previous study which showed that a ureasenegative mutant of Y. pseudotuberculosis is as virulent as the wild-type strain upon i.g. infection of mice (30). Remarkably, our results as well as those previously reported by Butler et al. (11) demonstrate that virulence of Y. pestis by the oral route is similar to or even higher than that of its enteropathogenic progenitor Y. pseudotuberculosis (13). Not only urease but two other adhesins or invasins (Inv and YadA) thought to be important for the virulence of enteropathogenic Yersinia are nonfunctional in Y. pestis. This suggests either that none of these proteins are essential for pathogenesis of Y. pestis by the oral route or that this species has acquired specific factors that may replace the defective proteins for enteric invasion.

Why is Y. pestis nonureolytic while the urease activity of Y.

pseudotuberculosis is so strong and so well conserved? Loss of this property by the plague agent may have been either advantageous or neutral for the organism. In the first possibility, the benefit would reside in the mammalian host or in the flea vector. The results of this study demonstrate that production of an active urease does not alter the course of infection in the mouse model and thus does not appear to play a role in the mammalian host. Alternatively, urease silencing could enhance flea transmission of the plague bacillus. A measurement of the survival rate of urease-positive and -negative Y. pestis within the flea vector could help answer this question. If, on the other hand, urease silencing has no effect, it may be because this function is no longer required in the new flea-host-flea life cycle adopted by Y. pestis. Indeed, loss of a function useful for oral infection is predictable in an organism that has acquired the ability to be transmitted by fleas. However, this hypothesis is not valid since our results and those of other authors (11) indicate that Y. pestis is at least as virulent as the enteropathogen Y. pseudotuberculosis when injected orally. Therefore, the various genes that have been silenced in Y. pestis are not necessary for oral transmission. The primary use of urease in prokaryotes is to permit microorganisms living in soil and water to use urea, the main nitrogenous waste product of mammals in the environment, as a source of nitrogen through ammonia generation. Since Y. pestis spends its life most exclusively in a flea-host-flea cycle, the organism can lose with impunity functions once needed to assure survival in natural environments in competition with saprophytes. Nonetheless, Y. pestis also has the capacity of long-term survival in the soil, like Y. pseudotuberculosis (3, 6, 23, 25). Therefore, transient expression of an active urease by Y. pestis might be useful for the pathogen during the temporary saprophytic stage of its life cycle.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported partly by the Conseil Régional Nord-Pas de Calais; the DGA (grant 99 34 028); and the European Regional Development Fund. Florent Sebbane received a scholar fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie.

The contribution of Annie Guiyoule to the initial step of this work is gratefully acknowledged. We also thank Pascal Vincent for assistance in statistical analysis and Shamila Nair for reading the manuscript.

#### REFERENCES

- Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel. 1999. Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14043–14048.
- Appelmelk, B. J., S. L. Martin, M. A. Monteiro, C. A. Clayton, A. A. McColm, P. Zheng, T. Verboom, J. J. Maaskant, D. H. van den Eijnden, C. H. Hokke, M. B. Perry, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters. 1999. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in 3-α fucosyltransferase genes. Infect. Immun. 67:5361-5366.
- Barre, N., H. Bercovier, M. Treignier, and J. Brault. 1979. Bilan d'unc enquête épidémiologique sur les yersinioses dans un écosystème agrosylvatique en région parisienne. I - Recherche des *Yersinia* dans le sol, les oligochètes et la végétation. Med. Mal. Infect. 9:34–39.
- Bercovier, H., H. H. Mollaret, J.-M. Alonso, J. Brault, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner. 1980. Intra- and interspecies relatedness of Yersinia pestis by DNA hybridization and its relationship to Yersinia pseudotuberculosis. Curr. Microbiol. 4:225–229.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513–1523.
- Brubaker, R. R. 1991. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniac. Clin. Microbiol. Rev. 4:309–324.

#### 176 SEBBANE ET AL.

- Brubaker, R. R., and A. Sulen, Jr. 1971. Mutations influencing the assimilation of nitrogen by *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 3:580–588.
- Buchrieser, C., S. D. Weagant, and C. W. Kaspar. 1994. Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA fragments to *ail* and pYV probes. Appl. Environ. Microbiol. 60:4371-4379.
- Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guiyoule, and E. Carniel. 1998. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn tRNA* genes. Mol. Microbiol. 30:965–978.
- 10. Butler, T. 1983. Plague and other *Yersinia* infections. Plenum Press, New York, N.Y.
- Butler, T., Y.-S. Fu, L. Furman, C. Almeida, and A. Almeida. 1982. Experimental *Yersinia pestis* infection in rodents after intragastric inoculation and ingestion of bacteria. Infect. Immun. 36:1160–1167.
- Conchas, R. F., and E. Carniel. 1990. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. Gene 87:133–137.
- de Almeida, A. M., A. Guiyoule, I. Guilvout, I. Iteman, G. Baranton, and E. Carniel. 1993. Chromosomal *ip2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. Microb. Pathog. 14:9–21.
- De Koning-Ward, T. F., and R. M. Robins-Browne. 1995. Contribution of urcase to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 63:3790– 3795.
- 15. De Koning-Ward, T. F., and R. M. Robins-Browne. 1996. Analysis of the urease gene complex of members of the genus *Yersinia*. Gene 182:225-228.
- Ellington, A. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 241–245. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), Current protocols in molecular biology. John Wilcy & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Girard, G., and J. Robic. 1936. La vaccination de l'homme contre la peste au moyen de bacilles vivants (virus vaccin E.V.), son application à Madagascar. Bull. Off. Int. Hyg. Publique 28:1078-1087.
  Gripenberg-Lerche, C., L. Zhang, P. Ahtonen, P. Toivanen, and M. Skurnik.
- Gripenberg-Lerche, C., L. Zhang, P. Ahtonen, P. Toivanen, and M. Skurnik. 2000. Construction of urcasc-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8. Role of urcase in virulence and arthritogenicity. Infect. Immun. 68:942–947.
- Guiyoule, A., F. Grimont, I. Iteman, P. A. D. Grimont, M. Lefèvre, and E. Carniel. 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. J. Clin. Microbiol. 32:634–641.
- Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro. 1999. Molecular switches the ON and OFF of bacterial phase variation. Mol. Microbiol. 33:919–932.
- Htun, H., and J. E. Dahlberg. 1988. Single strands, triple strands, and kinks in H-DNA. Science 241:1791–1796.
- Jennings, M. P., Y. N. Srikhanta, E. R. Moxon, M. Kramer, J. T. Poolman, B. Kuipers, and P. van der Ley. 1999. The genetic basis of phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. Microbiology 145:3013–3021.
- Karimi, Y. 1963. Conservation naturelle de la peste dans le sol. Bull. Soc. Pathol. Exot. 6:1183–1186.
- 24. Mobley, H. L. T., M. D. Island, and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology

Editor: E. I. Tuomanen

of microbial ureases. Microbiol. Rev. 59:451-480.

- Mollaret, H. H. 1963. Conservation expérimentale de la peste dans le sol. Bull. Soc. Pathol. Exot. 6:1168–1182.
- Mollaret, H. H., V. B. Nguyen, M. Vandekerkove, Y. Karimi, and M. Eftekhari. 1964. Sur l'uréase du bacille de Yersin. Ann. Inst. Pasteur 107: 424–429.
- Perry, R. D., and J. D. Fetherston. 1997. Yersinia pestis: etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 10:35–66.
- Perry, R. D., S. C. Straley, J. D. Fetherston, D. J. Rose, J. Gregor, and F. R. Blattner. 1998. DNA sequencing and analysis of the low-Ca<sup>2+</sup>-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. Infect. Immun. 66:4611-4623.
- Reed, L. J., and H. A. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493–497.
- Riot, B., P. Berche, and M. Simonet. 1997. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. Infect. Immun. 5:1985–1990.
- Ripley, L. S. 1990. Frameshift mutation: determinants of specificity. Annu. Rev. Genet. 24:189–213.
- Roggenkamp, A., A. M. Geiger, L. Leitritz, A. Kessler, and J. Heesemann. 1997. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by antirecombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. Infect. Immun. 65:446–451.
- Rosqvist, R., M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1988. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. Nature 334:522– 525.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 35. Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau, and P. Berche. 1996. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. Infect. Immun. 64:375–379.
- 6. Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervela. 2000. Characterization of the Oantigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Mol. Microbiol. 37:316–330.
- Surgalla, M. J., and E. D. Beesley. 1969. Congo red agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*. Appl. Microbiol. 18:834–837.
- Trieu-Cuot, P., C. Carlier, C. Poyart-Salmeron, and P. Courvalin. 1991. An integrative vector exploiting the transposition properties of Tn1545 for insertional mutagenesis and cloning of genes from Gram-positive bacteria. Gene 106:21–27.
- Wren, B. W., S. M. Colby, R. R. Cubberley, and M. J. Pallen. 1992. Degenerate PCR primers for the amplification of fragments from genes encoding response regulators from a range of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 78:287-291.
- 40. Yang, Y., J. J. Merriam, J. P. Mueller, and R. R. Isberg. 1996. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. Infect. Immun. 64:2483–2489.
Publication n°2

# Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic yersinia

Florent Sebbane, Marie-André Mandrand-Berthelot and Michel Simonet

En cours de correction pour Journal of Bactreriology

# Genes Encoding Specific Nickel Transport Systems Flank the Chromosomal Urease Locus of Pathogenic Yersiniae

FLORENT SEBBANE<sup>1</sup>, MARIE-ANDREE MANDRAND-BERTHELOT<sup>2</sup>

# and MICHEL SIMONET $^{1}*$

Equipe Inserm E9919-Université JE2225-Institut Pasteur de Lille,

Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses, Institut de Biologie de Lille, F-59021 Lille, France<sup>1</sup>, and Unité de Microbiologie et Génétique, Composante INSA, UMR 5122 CNRS-UCB-INSA, F-69622 Villeurbanne, France<sup>2</sup>

\*Corresponding author. Mailing address: Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59021 Lille Cedex, France.

Phone: +33 3 20 87 11 78. Fax: +33 3 20 87 11 83. E-mail: michel.simonet@ibl.fr

The transition metal nickel is a essential cofactor for a number of bacterial enzymes, one of which is urease. Prior to its incorporation into metalloenzyme active sites, nickel must be imported into the cell. Here, we report identification of two loci corresponding to nickel-specific transport systems in the Gram-negative, ureolytic bacterium Yersinia pseudotuberculosis: the loci are located on each side of the chromosomal urease gene cluster *ureABCEFGD* and have the same orientation as the latter. The *yntABCDE* locus was found upstream of the ure genes. The five predicted products show sequence homology with ATP-binding cassette nickel permeases present in several Gram-negative bacteria. The ureH gene, located downstream of ure, encoded a single-component carrier which displays homology to polypeptides of the nickel-cobalt transporter family. Transporters with homology to these two classes are also present (again in close vicinity to the urease locus) in the other two pathogenic yersiniae, Y. pestis and Y. enterocolitica. An Escherichia coli nikA insertion mutant recovered nickel uptake ability following heterologous complementation with either the Y. pseudotuberculosis ynt or ureH plasmid-borne genes, demonstrating that each carrier is necessary and sufficient for nickel transport. Deletion of ynt in Y. pseudotuberculosis almost completely abolished bacterial urease activity, whereas deletion of *ureH* had no effect. Nevertheless, rates of nickel transport were significantly altered in both ynt and ureH mutants (around 15% and 60% of initial rates respectively, when compared with the parent strain). Furthermore, the ynt ureH double mutant was totally devoid of nickel uptake ability, thus indicating that Ynt and UreH constitute the only routes for nickel entry. This is the first reported identification of genes coding for both kinds of nickel-specific permease situated adjacent to the urease gene cluster in the genome of a microorganism.

Urease, produced by a wide range of eukaryotic and prokaryotic organisms, is an enzyme that hydrolyses urea to give ammonia and carbamate. This multimeric enzyme requires nickel for activity and is thus classed as a metallo-enzyme (19). Bacteria have devised elaborate mechanisms for acquisition and incorporation of the divalent nickel ion. Nickel uptake constitutes the first step in this process. Diffusion of cations through the outer membrane of Gram-negative bacteria occurs preferentially via the OmpC and OmpF porins (21). Translocation of nickel through the cytoplasmic membrane is then mediated by the nonspecific CorA and Mgt magnesium transport systems (28) and/or high-affinity, nickelspecific permeases (10). To date, two classes of high-affinity nickel transporters have been described in bacteria. The first - the Nik system - was originally identified as being essential for hydrogenase activity in Escherichia coli, and is a member of the ATP-binding cassette (ABC) family. It consists of five components: a periplasmic binding protein (NikA) exhibiting high specificity for nickel; two integral cytoplasmic membrane proteins (NikB and NikC) assumed to form a channel for nickel transport; and finally, two membrane-associated ATPases (NikD and NikE) which are responsible for coupling energy to the transport process (20). Expression of the E. coli nik operon is activated (in the absence of oxygen) by the global regulatory protein FNR and repressed (in the presence of high nickel concentrations) by the nickel-responsive regulator NikR, which is functionally similar to the Fur ferric ion uptake regulator (4, 6, 34). Similar ABC transport systems with significant homology to the E. coli Nik proteins have recently been described in two human pathogens: Vibrio parahaemolyticus (22) and Brucella suis (15).

The second type of nickel importer is a single-component permease: the prototype of this class is HoxN from *Ralstonia eutropha* (previously *Alcaligenes eutrophus*). HoxN is an integral protein containing eight membrane-spanning segments (11). Members of this family have been identified in a number of Gram-negative and Gram-positive bacteria, including

*Helicobacter pylori, Bradyrhizobium japonicum* and *Mycobacterium tuberculosis,* as well as in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (9). Mutations in either specific transport system lead to a dramatic reduction in bacterial nickel uptake and, consequently, to decreased activity of the relevant nickel-requiring urease and hydrogenase enzymes (10, 14, 20).

The Gram-negative enteropathogenic bacterium Yersinia pseudotuberculosis is an ureolytic species responsible for self-limiting, intestinal tract infection in humans. We have recently characterized genes involved in enzyme biosynthesis (24). Three adjacent chromosomal genes (*ureA*, *ureB* and *ureC*) encode the structural subunits which associate to constitute an inactive apo-enzyme. Correct assembly of the structural subunits and incorporation of nickel ions into the enzyme's catalytic site (located in the UreC protein) requires at least four additional genes (*ureE*, *ureF*, *ureG* and *ureD*, situated in that order on the chromosome) contiguous to the structural genes. In this report, we show that *Y*. *pseudotuberculosis* produces two different types of specific nickel transporter (the synthesis of which is mediated by genes flanking the 5' and 3' ends of the *ure* locus): a multicomponent ABC nickel transporter encoded by the *ureH* gene and located downstream of *ure*.

# MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The main characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Y. pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* strains were grown at 28°C and 37°C respectively, in Luria-Bertani (LB) broth or on agar plates. Mating experiments were plated on M9 minimum medium agar (33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8.5 mM NaCl; 18 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.3 µM thiamine; 10 mM glucose; 14 g/l agar). Ampicillin (Ap, 100 µg ml<sup>-1</sup>),

kanamycin (Km, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and chloramphenicol (Cm, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) were added to growth media for bacterial selection when necessary.

Yersinia and Escherichia strains were characterized with API 20E strips (bioMérieux). Detection of urease activity was performed using urea agar (26) and urea-indole medium (Diagnostics Pasteur).

Nucleic acid manipulations. Genomic DNA extraction and small-scale isolation of plasmid DNA were performed as previously described (25). Large-scale plasmid DNA preparations were purified on Qiagen columns in accordance with the manufacturer's recommendations (Qiagen GmbH). Genomic and plasmid DNAs were digested with the appropriate restriction endonucleases purchased from GIBCO BRL or Promega: the resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis (0.8 - 1.2% agarose) and transferred onto Hybond-N+ membranes (Amersham) using the Southern technique. Restriction fragments were eluted from agarose gels with the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen GmbH). DNA fragments were ligated to endonuclease-restricted vectors via standard T4 DNA ligase procedures (GIBCO BRL). Recombinant plasmid DNAs were introduced into *E. coli* and *Yersinia* by transformation (25) and electroporation (5) respectively.

Prehybridization, hybridization of membrane-blotted DNA or RNA with digoxigeninlabeled DNA probes under stringent conditions and detection of nucleic acid hybrids were all performed with the DIG hybridization and detection kit from Boehringer Mannheim.

Nucleotide sequence determination was performed by the dideoxy chain-termination method, using the ABI PRISM dichloRhodamine Dye Terminator Sequencing kit with Amplitaq DNA polymerase FS (Perkin Elmer), according to the manufacturer's instructions. Extension products were analyzed with the Applied Biosystems ABI 3700 automated DNA sequencer (Perkin Elmer). Nucleotide sequences were analyzed with Perkin Elmer software ("Sequence Analysis" and "Sequence"). Multiple protein alignment was carried out using the CLUSTAL\_X program.

PCR reactions. PCR amplification was performed in a 100-µl reaction volume with a thermal cycler (the 2400 model from Perkin-Elmer Cetus). Fifty nanograms of target DNA, 0.1 nmol of each primer and 1 U of thermostable DNA polymerase were mixed in the corresponding 1X polymerase buffer (200 mM in each deoxynucleotide triphosphate). Amplification involved 30 cycles, each consisting of (i) a 1 min denaturation step at 94°C, (ii) a 1 min annealing step at 55°C and (iii) a 1 min polymerization step at 72°C. Digoxigenin-labeled PCR products were generated using PCR DIG Labeling Mix from Boehringer Mannheim. Amplimers were purified on SpinX columns (Corning Costar Corporation).

Oligonucleotide primers. Nineteen primers were synthesized (by Sigma and Genset) for PCR generation of DNA fragments to be cloned or used as probes. The  $(5' \rightarrow 3')$  nucleotide sequences were as follows: N1, CCCAAGCTTGAGCTCGCCTGATGCCTTTGGTGTGT; N2, TGCACTGCAGAGTGATTGCCTGTCAGGCA; N3. CGGGATCCCATTTGGGGTTA GCAATGG: N4. CCGGAATTCGAGCTCCTGACGCAGCATTTACCATC; N5. TATCAGCCAGTGATCCAAGCA; N6, TCAACCCTACCCGTTCTGAC; N7, GCGGAAT TCGAGTGAATTATTAGACCCGC; N8, GTCGAGCTCGATGCAATCCAACATATCGC; GGTTGTAATACGCATGAGCC; N9, N10, CTCAGTGAGCGAATTCAAC; N11, CGTGGTTGCTGACACTTAAG; N12, CGCCAATTATTGGCCGATCA; N13, ATCTGGCC AATAACTGCG; K1, GCTCTGAATTCGATATCGGGGGAAAGCCACGTTGTGTC; K2, GATTGGAATTCGATATCCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAA; C1, TCAGCGCTAGCGG AGTG; C2, GATCTGCATCGCAGGAT; C3, TGCACTGCAGCACTCCGCTAGCGCTGA; C4, CGGGATCCGATCTGCATCGCAGGAT.

Urease extract preparation and enzyme activity measurement. Overnight Yersinia cultures at 28°C in LB broth were adjusted to  $10^5$  cells per ml: 50 µl of bacterial culture were

then added to 50 ml of fresh LB broth. Yersinia from a 36-hr (stationary phase) culture were harvested by centrifugation (2,600 x g) for 5 min at 4°C and washed twice with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8). Bacterial cells were resuspended in phosphate buffer and disrupted twice using a French press (10,000 lb/in<sup>2</sup>). Following centrifugation (12,800 x g) for 30 min at 4°C, supernatants were placed on ice. Protein concentration was determined by the Bradford dye-binding procedure according to the manufacturer's instruction (Bio-Rad). The urease activity of extracts was determined by measuring the amount of ammonia released from urea in the phenol-hypochlorite assay (17). Two  $\mu g$  of total proteins from bacterial extracts were added to 200 µl of 50 mM urea in 0.1 M sodium phosphate (pH 6.8), and the mixture was incubated at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by addition of 400 µl of phenolnitroprusside solution (50 g of phenol and 250 mg of sodium nitroprusside per liter). Four hundred µl of sodium hydroxide (11N) - sodium hypochlorite (0.175%, vol/vol) solution were added, and the contents were mixed well. Following incubation at 50°C for 6 min, the absorbance at 625 nm was measured. A standard ammonium chloride concentration curve was determined to be linear between 28 and 448 nanomoles of ammonia. Absorbance values were converted to nanomoles of ammonia based on the ammonium chloride standard curve. Data are presented in terms of urease specific activity, defined as micromoles of NH<sub>3</sub>/min/mg of protein. Two µg of total proteins from bacterial extracts boiled for 5 min served as the negative control, and the background was subtracted from all values obtained to avoid measuring ammonia generated by urease-independent reactions.

Nickel transport. *E. coli* and *Y. pseudotuberculosis* strains were grown until the midexponential growth phase under microaerobic conditions in LB broth medium supplemented with molybdate and selenite, as previously described (34). The cells were washed twice and resuspended in 1 ml of transport buffer (66 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8, 11 mM glucose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithionite) to a final concentration of approximately 3-5 mg dry matter/ml. Solutions were purged with nitrogen and equilibrated in a 30°C water bath for five minutes.

The assay was started by addition of  ${}^{63}$ NiCl<sub>2</sub> (0.92 mCi µmol<sup>-1</sup>, Amersham), giving a concentration of 150 nM. Samples (0.1 ml) were taken at regular time intervals, filtered through cellulose nitrate membrane filters (Whatman, 0.45 µm pore size) and washed twice with 2 ml of rinsing buffer (66 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10 mM EDTA). Filters were placed in scintillation vials containing 5 ml of scintillation fluid (ACS, Amersham) for counting in a Packard liquid scintillation counter. Nickel uptake is expressed as picomoles of Ni<sup>2+</sup> taken up per milligram of bacterial dry weight.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data reported here have been deposited in the GenBank nucleotide sequence data base (accession numbers AF412327 and AF412328).

#### RESULTS

*ureH*, encoding a putative nickel transporter, is located downstream of the Y. pseudotuberculosis urease locus. We first sequenced the 3' region flanking the *ure* locus by using cosmid pMS89 - this contains a ~30 kb DNA fragment encompassing the *ureABCEFGD* urease encoding genes of Y. pseudotuberculosis 32777 (24). We then identified a gene encoding an urea transporter (referred to as *yut*, article submitted for publication) adjacent to and 378 nucleotides downstream of *ureD*, the last gene in the *ure* locus. Subsequently, we identified another gene (*ureH*, 1059 bp) situated 148 bp downstream of *yut*: *ureH* codes for a putative 353-amino acid protein (calculated mass, 38,693 Da) homologous to nickel permeases from *R. eutropha* (HoxN; 45 and 59% identity and homology, respectively), *Bradyrhizobium japonicum* (HupN; 43 and 57%), *Mycobacterium tuberculosis* (NicT; 37 and 52%) and *Helicobacter pylori* (NixA; 35 and 51%) (Fig. 1). The similarities between the putative product of *ureH* and these proteins, together with the *ureH*  gene's location close to the *Y. pseudotuberculosis ure* locus, strongly suggest to us that UreH is a nickel transporter. Two other arguments strengthen this hypothesis. Firstly, computerized hydropathy analysis of UreH (not shown) indicates that the protein may form eight transmembrane segments, with the carboxy- and amino-terminal regions thus being localized in the cytoplasmic compartment - a topological feature shared by several single-peptide nickel transporters (11, 12). Secondly, four motifs (RHAXDADHI, FXXGHSTIV, LGXDTATE, and GMXXXDSXD) which are critical for transport activity in single-component nickel permeases (11, 12) were found in UreH at positions 61 to 69, 93 to 101, 207 to 214, and 244 to 252 respectively (Fig. 1).

Inactivation of the *ureH* gene does not abolish urease activity in Y. pseudotuberculosis. With the aim of establishing whether the UreH nickel carrier is essential for urease activity in Y. pseudotuberculosis, a *ureH* mutant (MYUH) was engineered from wild type strain 32777. A 1093-bp intragenic deletion was replaced by a kanamycin resistance cassette. This was achieved by allelic exchange after mating Y. pseudotuberculosis strain 32777 with E. coli strain SM10  $\lambda pir$  harboring the pFS $\Delta$ U plasmid (see Table 1). The MYUH *ureH* mutant was selected on sucrose agar (2). Its genotype was confirmed by PCR assays using primer sets N11/K2 and N12/K1 and by Southern blot hybridization with appropriate DNA probes (Fig.2).

The ability of the MYUH mutant to degrade urea was tested in bacteria cultured in LB broth. Surprisingly, no significant difference in ureolytic activity was found, compared with the wild type strain. Next, enzyme activity was determined using media with limiting and high nickel ion concentrations respectively, in order to account for the possibility that UreH functionality might be metal dose-dependent. Again, no difference between the wild-type and *ureH* mutant strains was detected after growth of bacteria in LB broth containing increasing amounts of either nickel chloride or the nickel chelator nitrilotriacetic acid (NTA) (Fig.3).

Furthermore, urease activity of the mutant was similar to that of the parent (data not shown) when the bacteria were cultured in the presence of 100 mM  $MgCl_2$  – this has the effect of saturating nonspecific, divalent cation transporters (9) that could otherwise impede detection of nickel transport by UreH.

Nickel uptake is restored in a E. coli nikA mutant trans-complemented with the Y. pseudotuberculosis ureH gene. Although no difference in ureolytic activity could be observed when comparing the mutant and wild type strains, UreH was shown to behave as a nickel carrier via heterologous complementation of an E. coli nickel transporter-deficient nikA mutant (HPX72) with the Y. pseudotuberculosis ureH gene. Firstly, strain HPX72 recovered its ability to degrade usea following introduction of compatible plasmids bearing ureH (pFS45) and the ure locus with its promoter region (pFS50). As a control, we confirmed that strain HPX72 containing pFS50 alone was non-ureolytic. In addition, presence of the ureH gene restored hydrogenase activity to the level measured with the E. coli wild-type strain P4X (data not shown). Therefore, the Y. pseudotuberculosis ureH gene appears to be able to functionally replace the E. coli nik locus, thus allowing production of active urease and hydrogenase. Secondly, nickel uptake assays were performed in order to substantiate the role of UreH in nickel transport. Assays were conducted in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> (so as to saturate nonspecific nickel uptake via magnesium transport systems) and at low nickel concentrations (150 nM). Interestingly, introduction of plasmid pFS45 restored HPX72's rate of nickel transport to a level similar to that obtained by homologous complementation of the mutant with pLW21 bearing the entire E. coli nik locus (Fig. 4A).

The 5' end of the Y. pseudotuberculosis urease locus is flanked by the Ynt ABC-nickel transport system. Since urease activity in Y. pseudotuberculosis was not impaired by ureH inactivation, we suspected the existence of another nickel carrier in this bacterium. Sequencing of the 5-kb DNA region upstream of *ureA* allowed identification of five ORFs.

ORF1 (1578 bp), ORF2 (969 bp), ORF3 (807 bp), ORF4 (807 bp), and ORF5 (666 bp) are apparently arranged in an operon-like manner since (i) all are transcribed in the same direction and (ii) intergenic spaces between neighboring ORFs vary between -1 and -8 nucleotides. ORF5 was situated 1198 bp from ureA, the first gene of the ure locus. The putative proteins encoded by these five ORFs show striking amino acid sequence similarities to components of the E. coli Nik specific nickel ABC transport system - between 25 and 32 % identity, depending on the operon component in question (20). ORF1 encodes a 525 amino acid protein (predicted molecular mass of 57,820) which is homologous to the E. coli NikA periplasmic nickel-binding protein. The putative ORF2 and ORF3 polypeptides (322 and 268 amino acids with calculated molecular masses of 35,233 and 30,002 respectively) were predicted to contain six potential transmembrane domains, displaying similarity to the NikB and NikC integral cytoplasmic membrane proteins. Like NikD and NikE, ORF4 (268 amino acids, molecular mass of 29,472) and ORF5 (221 amino acids, molecular mass of 24,754) possess characteristic ATP-binding domains (32), suggesting a role in coupling energy to the transport process. ORF1 to ORF5 also showed homology to the nikABCDE cluster of B. suis (24% to 32% identity) (15) and that of V. parahaemolyticus (33% to 41% identity) (22). They also share 34 to 43 % identity with the dipeptide transport system encoded by the dpp operon from Streptococcus pyogenes (23). Furthermore, the Y. pseudotuberculosis gene cluster exhibits the highest homology of all (51 to 72 % identity) with the oxd-6 operon from Salmonella typhimurium: it has been supposed that this operon encodes a nickel or peptide transporter (33) but the matter has yet not been clearly resolved. Finally, the putative ORF1 product was found to be 70% identical to that of an unidentified ORF (also referred to as Orf-1) which follows the regulatory ureR gene present on a 160-kb plasmid in a urease-producing, pathogenic E. coli strain (8). On the whole, these features suggest that the five ORFs code for a nickel transport system, and we thus named them ynt (for Yersinia nickel transport) A, B, C,

D & E respectively. To definitely prove that they were involved in Ni<sup>2+</sup> uptake by bacterial cells, we implemented the experimental approach used above for the *ureH* gene. When plasmid pFS78 bearing the *yntABCDE* operon was introduced into *E. coli nikA* mutant HPX72 (harboring the inactive urease cluster borne on plasmid pFS50), ureolytic capacity was restored. In addition, examination of nickel uptake revealed a dramatic stimulation of nickel entry via the Ynt system when compared to that displayed by the UreH system or by the *E. coli* Nik transporter (Fig.4A).

The Ynt transport system plays a major role in  $Ni^{2+}$  uptake in Y. pseudotuberculosis. To assess the Ynt proteins' physiological role in Y. pseudotuberculosis, a ynt-deficient mutant was constructed from wild type strain 32777, using the method described above for the MYUH mutant. Complete deletion of the ynt operon was obtained by using plasmid pFS $\Delta O$ (see Table 1). The genotype of the resulting *vnt* mutant MYNT was further confirmed by PCR assays using the primer sets N9-C1 and N10-C2 and by Southern blot hybridization with appropriate DNA probes (Fig. 2). After growth in LB broth, the *ynt* mutant's urease activity was dramatically reduced (by 99%) when compared with the wild type strain (0.05 versus 4.8 µM NH<sub>3</sub>/min/mg of protein), and was completely abolished by concomitant inactivation of *ureH* ( $\leq 0.01 \,\mu$ M NH<sub>3</sub>/min/mg of protein). These data indicate that the *ynt* genes are essential for urease activation, whereas *ureH* plays a minor role. To determine the respective contributions of each Y. pseudotuberculosis nickel transporter, the ability of the single or double *ureH* and *ynt* mutants to take up nickel was compared with that of the parental strain. Accumulation of nickel by the MYOU double mutant was essentially zero. Uptake in the single mutants MYUH and MYNT can therefore be ascribed to nickel transport by the sole remaining transport system present in these strains. Time course experiments demonstrated that the MYUH mutant's Ynt system gave a significantly higher rate of uptake than the MYNT mutant's UreH transporter (Fig.4B).

#### DISCUSSION

Nickel transporters have been shown to play a critical role in the biosynthesis of nickeldependent enzymes such as hydrogenases and ureases (10). In the present study, we showed that the human and animal pathogen Y. pseudotuberculosis is able to synthesize two distinct, nickel-specific transport systems, both of which are required for full catalytic activity of urease. Interestingly, each of the two types of nickel transporters identified to date in other organisms is represented: (i) a characteristic, five-component ABC transport system encoded by the *yntABCDE* gene cluster, which shows some degree of similarity to the Nik system in several Gram-negative bacteria (15, 20, 22); and (ii) a single component carrier encoded by the *ureH* gene, displaying homology to polypeptides of the nickel-cobalt transporter family exemplified by HoxN (11). To our knowledge, this is the first report demonstrating the presence of two nickel-specific permeases in a prokaryote. We reached this conclusion by using two complementary approaches. Firstly, nickel uptake was restored in a E. coli nik mutant expressing either the Ynt complex or UreH from Y. pseudotuberculosis. These transcomplementation data indicate that each carrier is necessary and sufficient to functionally replace the mutated E. coli genes. Secondly, direct measurement of nickel entry into Y. pseudotuberculosis mutant strains revealed that uptake was significantly reduced by inactivation of ynt or ureH. Moreover, complete suppression of nickel transport in the ynt ureH double mutant indicated that apart from Ynt and UreH, there are no other Ni<sup>2+</sup>-specific transport systems in Y. pseudotuberculosis.

Database searches revealed that genes homologous to *ureH* and *ynt* are present in the genome of the other two pathogenic *Yersinia* species - *Y. pestis* (p) and *Y. enterocolitica* (ent). Deduced amino acid sequences from  $ureH_p$  and  $ureH_{ent}$  are 99 and 93 % identical respectively to that of the *ureH* product from *Y. pseudotuberculosis*, whereas putative Ynt<sub>p</sub> and Ynt<sub>ent</sub>

complexes share 99 and 91.6 % of residues respectively with Ynt proteins from Y. pseudotuberculosis. Phylogenetic analysis of the putative periplasmic nickel-binding protein encoded by the yntA gene from these three pathogenic Yersinia showed that YntA, YntA<sub>p</sub> and YntA<sub>ent</sub> cluster with the S. typhimurium nickel-binding protein related Oxd-6a polypeptide, and also with the orfl gene product from urease-producing E. coli strains (Fig.5). It is strongly suspected that the FNR-regulated oxd-6abcde gene cluster recently discovered in Salmonella encodes a nickel transport system (33). However, attempts to demonstrate such a function for this locus using nickel sensitivity disk assays remained unsuccessful, since no difference was observed between the wild type strain and the isogenic oxd-6 mutant. Using the same test, the E. coli wild-type strain and the isogenic nik mutant were also shown to be equally sensitive to nickel (20). Nevertheless, considering the high degree of identity of the Oxd-6 complex to the Y. pseudotuberculosis Ynt nickel permease (between 51 and 72 %, depending on the component in question), we suppose that Oxd-6 also transports nickel ions in Salmonella. Hence, besides the Nik transport system group, the bacterial nickel-ABC transporter family includes another subclass, with Ynt as a prototype carrier and two other members produced by Salmonella and some E. coli isolates.

For several bacterial species in which nickel-transport systems were characterized, genes specifying these carriers were found within or in close proximity to genetic loci encoding the nickel-requiring enzymes urease (1, 16, 22) or hydrogenase (11). In addition, nickel permeases of the ABC family are encoded by gene clusters which are harbored either on a plasmid (8) or a pathogenicity island (22), or indeed are adjacent to an insertion sequence (1, 22). In *Y. pseudotuberculosis, ureH* flanks the *yut* gene, located just downstream of the urease accessory gene *ureD*, whereas the *yntABCDE* polycistronic unit is upstream of the *ureA* structural urease gene. The fact that the intergenic space (1198 bp) between *yntE* and *ureA* has a low G+C content (34%, versus 47% for the whole *Y. pseudotuberculosis* genome)

and includes many repeated sequences is noteworthy. Furthermore, a copy of insertion sequence IS285 is present 1848 bp upstream of the Y. pestis yntA gene. Taken together, these genetic features suggest that the chromosomal region containing the ynt operon has been the site of DNA recombination events, and that the nickel ABC transport system could have been acquired by yersiniae through horizontal gene transfer.

Nickel uptake assays in Y. pseudotuberculosis ureH and ynt mutants revealed that cellular entry of this divalent cation occurs principally via the Ynt ABC transporter. Under the experimental conditions used for the assay, initial rates of nickel uptake by ynt and ureH mutants reached around 15 % and 60 % respectively of the wild type value (Fig.4 B). Surprisingly, urease activity was not found to correlate with nickel accumulation inside the cells, since it was shown to be strongly reduced (99%) after vnt inactivation but did not significantly differ from that of wild type Y. pseudotuberculosis after ureH knock-out, regardless of nickel or magnesium concentrations in the growth medium. At least two hypotheses may account for these discrepancies between the mutants' ureolytic and nickel uptake capacities. Firstly, Y. pseudotuberculosis urease gene cluster expression could be regulated by nickel concentration, as has been recently demonstrated for H. pylori urease, which is induced by  $Ni^{2+}$  at the transcriptional level (30). Mutation of *ynt* would thus reduce intracellular nickel concentration to below the threshold necessary for induction. Secondly, nickel transfer from membrane permeases to UreE (the accessory protein which ultimately inserts metal ions into apo-urease) might involve protein-protein interactions: the affinity of UreE (or that of another intermediary component, if any) for the Ynt complex could be higher than for UreH.

Although weakly homologous (between 25 and 32 % identity) to *E. coli* Nik permease, the *Y. pseudotuberculosis* Ynt complex is functionally interchangeable with this ABC transporter. However, *E. coli* cells incorporated much more nickel when expressing *ynt* 

instead of the *nik* gene cluster (Fig. 4A). In the same heterogenous genetic background, UreH is also functional, and is as efficient as the endogenous Nik transport system (Fig. 4A). The differences in these systems' nickel transport capacities in *E. coli* may reside in their intrinsic biochemical properties, and could also be linked to their conformation in the cell membrane.

*Y. pseudotuberculosis* appears to be the first bacterium reported as producing two nickel-specific transport systems. The production of redundant permeases by yersiniae emphasizes the importance of the penetration of this divalent cation into the cell in relation to the biosynthesis of urease - and possibly that of other nickel-dependent enzymes. It also poses the question of their physiological role and raises the possibility that the two systems are expressed under different growth conditions at various stages of the life cycle.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

F. Sebbane received a doctoral studentship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur,de la Recherche et de la Technologie and from the Fondation pour la Recherche Médicale.This work was supported in part by the European Regional Development Fund.

#### REFERENCES

- 1. Bosse, J. T., H. D. Gilmour, and J. I. MacInnes. 2001. Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. 183: 1242-1247.
- Carnoy, C., C. Mullet, H. Muller-Alouf, E. Leteurtre, and M. Simonet. 2000. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. Infect. Immun. 68: 2553-2559.
- 3. Chang, A. C., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134: 1141-1156.

- Chivers, P. T., and R. T. Sauer. 2000. Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni<sup>2+</sup>-dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites.
   J. Biol. Chem. 275: 19735-19741.
- 5. Conchas, R. F., and E. Carniel. 1990. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. Gene 87: 133-137.
- De Pina, K., V. Desjardin, M. A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, and L. F.
   Wu. 1999. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickelresponsive regulator in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 670-674.
- Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 59: 4310-4317.
- D'Orazio, S. E., V. Thomas, and C. M. Collins. 1996. Activation of transcription at divergent urea-dependent promoters by the urease gene regulator UreR. Mol. Microbiol. 21: 643-655.
- 9. Eitinger, T., O. Degen, U. Bohnke, and M. Muller. 2000. Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis. J. Biol. Chem. 275: 18029-18033.
- 10. Eitinger, T., and M. A. Mandrand-Berthelot. 2000. Nickel transport systems in microorganisms. Arch. Microbiol. 173:1-9.
- Eitinger, T., L. Wolfram, O. Degen, and C. Anthon. 1997. A Ni<sup>2+</sup> binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. J. Biol. Chem. 272: 17139-17144.
- 12. Fulkerson, J. F., Jr., and H. L. Mobley. 2000. Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. J. Bacteriol. 182: 1722-1730.

- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- 14. Hendricks, J. K., and H. L. Mobley. 1997. *Helicobacter pylori* ABC transporter: effect of allelic exchange mutagenesis on urease activity. J. Bacteriol. **179**: 5892-5902.
- 15. Jubier-Maurin, V., A. Rodrigue, S. Ouahrani-Bettache, M. Layssac, M. A. Mandrand-Berthelot, S. Kohler, and J. P. Liautard. 2001. Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity. J. Bacteriol. 183: 426-434.
- 16. Maeda, M., M. Hidaka, A. Nakamura, H. Masaki, and T. Uozumi. 1994. Cloning, sequencing, and expression of thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176: 432-442.
- McGee, D. J., C. A. May, R. M. Garner, J. M. Himpsl, and H. L. Mobley. 1999.
   Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. J. Bacteriol. 181: 2477-2484.
- 18. Miller, V. L., and J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. **170**: 2575-2583.
- Mobley, H. L., M. D. Island, and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev. 59: 451-480.
- 20. Navarro, C., L. F. Wu, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding- protein-dependent transport system for nickel. Mol. Microbiol. 9: 1181-1191.
- Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. J. Biol. Chem. 269: 3905-3908.

- Park, K. S., T. Iida, Y. Yamaichi, T. Oyagi, K. Yamamoto, and T. Honda. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio* parahaemolyticus. Infect. Immun. 68: 5742-5748.
- 23. Podbielski, A., and B. A. Leonard. 1998. The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease. Mol. Microbiol. 28: 1323-1334.
- 24. Riot, B., P. Berche, and M. Simonet. 1997. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. Infect. Immun. 65: 1985-1990.
- Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 26. Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet. 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene. Infect. Immun. 69: 170-176.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio/Technology 1: 784-791.
- 28. Smith, R. L., M. A. Szegedy, L. M. Kucharski, C. Walker, R. M. Wiet, A. Redpath, M. T. Kaczmarek, and M. E. Maguire. 1998. The CorA Mg<sup>2+</sup> transport protein of Salmonella typhimurium. Mutagenesis of conserved residues in the third membrane domain identifies a Mg<sup>2+</sup> pore. J. Biol. Chem. 273: 28663-28669.
- 29. **Taylor, L. A., and R. E. Rose**. 1988. A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. Nucleic Acids Res. 16: 358.

- 30. van Vliet, A. H., E. J. Kuipers, B. Waidner, B. J. Davies, N. de Vries, C. W. Penn, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. Kist, S. Bereswill, and J. G. Kusters. 2001. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. Infect. Immun. 69: 4891-4897.
- Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259-268.
- 32. Walker, J. E., A. Eberle, N. J. Gay, M. J. Runswick, and M. Saraste. 1982. Conservation of structure in proton-translocating ATPases of *Escherichia coli* and mitochondria. Biochem. Soc. Trans. 10: 203-206.
- 33. Wei, Y., and C. G. Miller. 1999. Characterization of a group of anaerobically induced, *fnr*-dependent genes of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 181: 6092-6097.
- 34. Wu, L. F., and M. A. Mandrand-Berthelot. 1986. Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. Biochimie 68: 167-179.

#### FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Alignment of the amino acid sequence of the UreH protein from Y.pseudotuberculosis 32777 with those of nickel transporters from *R. eutropha* (HoxN), *B. japonicum* (HupN), *M. tuberculosis* (NicT) and *H. pylori* (NixA). Asterisks, colons and points indicate identical, similar and related amino acids, respectively. Dashes correspond to gaps introduced to optimize homology between sequences. Motifs critical for biological activity are highlighted.

FIG. 2. Genetic organization of the chromosomal urease locus and its immediate environment, and genotype analysis of *yntABCDE*-and *ureH*-deficient mutants from *Y*. *pseudotuberculosis* 32777. (A) *KpnI* (K) and *Eco*RI (E) restriction map of the chromosome of wild type strain 32777 and isogenic mutants MYUH (*ureH*) and MYNT (*ynt*). (B) Left, a Southern blot of *KpnI*-digested DNA from wild-type 32777 and the *yntABCDE*-deficient mutant hybridized with probe 1 (0.5 kb, corresponding to the downstream region of *yntE*) and probe 2 (1.4 kb, detecting the chloramphenicol resistance gene *cat*). Right, a Southern blot of *Eco*RI-digested DNA from wild-type 32777 and the *ureH*-deficient mutant hybridized with probe 3 (0.6 kb, corresponding to the upstream region of *ureH*) and probe 4 (1.3 kb, detecting the kanamycin resistance gene *aph-1a*). Primers N1-N12, K1, K2, C1 and C2 were used both for creating mutants and for checking their genotype. Numbers in brackets indicate the DNA sequence coordinates.

FIG. 3. Ureolytic activity of wild-type strain 32777 (gray) and the MYUH *ureH* mutant (black) following growth in LB broth containing increasing concentrations of (A) the nickel chelator nitrilotriacetic acid (NTA) or (B) NiCl<sub>2</sub>. Each bar is the mean value of three independent experiments  $\pm$  standard deviations.

FIG. 4. Role of UreH and Ynt in nickel entry into bacteria. Bacterial suspensions were incubated in the presence of 150 nM <sup>63</sup>NiCl2 and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Nickel uptake was assessed at regular intervals. Three separate experiments gave similar results. (A) Nickel uptake into the HPX72 nikA-deficient E. coli strain complemented with plasmids pFS45, pFS78 and pLW21 containing *ureH*, *yntABCDE* and *nikABCDE*, respectively. Symbols :  $\Diamond$ , strain , strain HPX72 (pFS45),  $\blacktriangle$ , strain HPX72 (pFS78);  $\blacklozenge$ , HXP72; strain HPX72 (pLW21). (B) Nickel uptake into Y. pseudotuberculosis isogenic mutants MYUH (ureH), MYNT (*yntABCDE*) and MYOU (*ureH yntABCDE*) derived from wild type strain 32777. Symbols :  $\blacksquare$ , strain 32777;  $\triangle$ , strain MYUH;  $\emptyset$ , strain MYNT; ο, strain MYOU

FIG. 5. Phylogenetic relationships amongst bacterial nickel ABC transporters. The unrooted tree, constructed using the Clustal X program, was based on multiple sequence alignment of periplasmic nickel-binding proteins from *B. suis* (Nik<sub>Bs</sub>, accession number AJ278644), *E. coli* (Nik<sub>Ec</sub>, accession number X73143; Orf-1, accession number L12007), *V. parahaemolyticus* (NikA<sub>Vp</sub>, accession number AB038238), *S. typhimurium* (Oxd-6a, accession number U94729), *Y. pestis* (YntA<sub>p</sub>, accession number AJ414153), *Y. enterocolitica* (YntA<sub>ent</sub>, http://www.sanger.ac.uk/Projects/Y\_enterocolitica/) and *Y. pseudotuberculosis* (YntA, accession number AF412327) by using the neighbor-joining (NJ) method. The scale bar (NJ distance) represents a 10% amino acid difference. Bootstrap values are indicated.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant properties <sup>a</sup>	Reference or origin
Straina		
Suams Versinia pseudotubercul		
Tersinia pseudolubercuit	uild trac strain	24
MVIIL	derived from stroin 20777 AugultO and 4.1 a	24 This mode
MION	derived from strain 52777, Aurensapha-ra	This work
MINI	derived from strain 52/17, ByriAbCDEszcal	I his work
MYOU	derived from strain 32/11, DyntABCDES2cat DureHS2aphA-1a	This work
Escherichia coli	and water	
DH5a	supE, AlacU169, (\$ 80dlacZAM15), thi, deoR, phoA, hsdR, recA, endA, gyrA, relA	13
SY327λpir	$\Delta$ (lac pro) argE (Am) recA rif nalA $\lambda$ pir; host for pCVD442 and derivatives	18
SM10 <i>\darbapir</i>	thi the leu sup tonA lacY recA::RP4-2Tc::MuKm $\lambda pir$ : host for pCVD442 and derivatives	27
P4X	Hfr metB	20
HPX72	derived from strain P4X, nikA::MudI (Km lac)	20
Plasmids		
pZero2-1	cloning vector, Km	Invitrogen
pUC18	cloning vector, Ap	31
pACYC184	plasmid vector, Cm, Tc; source of the chloramphenicol acetyltransferase cat gene	3
pUC4K	plasmid vector; Km; source of the aminoglycoside phosphotransferase aphA-1a gene	29
pCVD442	suicide vector containing the counter-selectable marker sacB; Ap	7
pMS89	pHC79Ω, ~35-kb Sau3A DNA fragment from Y. pseudotuberculosis 32777 containing the urease locus and its flanking regions.	24
pLW21	pUC19Ω, 7.1 kb SmaI insert with the nikABCDER region from E. coli K-12	20
pFS45	pUC18Ω, ~2.4kb XhoI/Bstb1107I insert with the 3'end of orfX and ureH from Y.pseudotuberculosis 32777	This work
pFS50	pACYC184Ω, ~7.3-kb HindIII/PstI insert with the Y.pseudotuberculosis 32777ure locus and its promoter region	This work
pFS78	pUC18Ω, ~5.5-kb PCR fragment N1-N13 containing ynt genes from Y.pseudotuberculosis 32777	This work
pFSU1	pZero2-1Ω, ~1.2-kb XbaI/EcoRI PCR-generated fragment with set primer N5-N6 encompassing the upstream region of ureH gene from Y. pseudotuberculosis	32777 This work
pFSU2	pFSU1Ω, ~0.8-kb SacI/EcoRI PCR-generated fragment with set primer N7-N8 encompassing the downstream region of ureH gene from Y. pseudotuberculosis	32777 This work
pFSU3	pFSU2Ω, ~1.3-kb EcoRI PCR-generated fragment with set primer K1-K2 encompassing aphA-1a from pUC4K	This work
pFSAU	pCVD442Ω, ~3.3-kb XbaI/SacI insert from pFSU3	This work
pFSO1	pUC18Q, ~0.5-kb HindIII/PstI PCR-generated fragment with set primer N1-N2 encompassing the upstream region of vntA gene from Y. pseudotuberculosis 32	2777 This work
pFSO2	pFSO1 $\Omega$ , ~0.5-kb BamHI/EcoRI PCR-generated fragment with set primer N3-N4 encompassing the downstream region of <i>vntE</i> gene from Y <i>nseudotuberculo</i>	sis 32777 This work
nFSO3	pFSO2Q. ~1.4-kb Pstl/BamHI PCR-generated fragment with set primer C3-C4 encompassing the cat gene from pACYC184	This work
nFSAO	nCVD442Q. ~2 4-kb Sacl insert from nESQ3	This work
Prode .	Por 2	THIS WOLK

<sup>a</sup> Ap, Cm, Km and Tc: resistance to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and tetracyclin respectively.  $\Omega$ , *in vitro* insertion.

#### FIGURE 1

UreH	eH <sup>1</sup> MTTIIASSSAFGNQQTKRRAIYLLIGLLVVNGLAWV-WAFAEFNDNAVLMGMAFLAYSFGLR	IAVDADHIAAIDNVTRKLMQQ
HoxN	<b>xN</b> <sup>1</sup> MFQL-LAGVRMNSTGRP-RAKIILLYALLIAFNIGAWL-CALAAFRDHPVLLGTALLAYGLGLRH	IAVDADHLAAIDNVTRKLMQD
HupN	$\mathbf{pN}$ $^{1}$ MLPFSMTGLEKDHTRGVLILANAHRRSERSRTASCAGPAVLFGGLITANIVAWA-WAFALFADRPVVMATALLAWVFGLRF	IAVDADHIAAIDNVVRSLMQT
NicT	${\tt ct} = {}^1 {\tt MASSQLDRQRSRSAKMNRALTAAEWWRLGLMFAVIVALHLVGWLTVTLLVEPARLSLGGKAFGIGVGLTAYTLGLREPART$	IAFDADHIAAIDNTTRKLMSD
NixA	<b>xA</b> <sup>1</sup> MAYMLGAKE	IAFDADHIACIDNTIRKLTQQ
		** **** * *** * *

 UreH
 GKTPIAVGTFFSLGHSTIVI---LASLAIAATAMAFKNN-MAWFHETGGLIGTLVSSVFLLLFAFLNLTILISVYKKFKQVKAGY---IYKDEELDLLVVNNGGLLS

 HoxN
 GRRPITAGLWFSLGHSSVVV---LASVLIAVMATTLQER-LDRFHEVGSVIGTLASALFLFAIAAINLVILRSAYRAFRRVRRGG---IYVEEDFDLLFGNRG-FLA

 HupN
 GGTPRSAGLYFALGHSSVVV---VATMLLALGVVSLGG--DGLLKEIGSFIGASVSALFLLVIAAINLAIFASLWRTFRKAREQG---IRDAAGLDALLAHRG-ILV

 NicT
 GHRPLAVGFFFSLGHSTVVFGLAVMLVTGLKAIVGPVENDSSTLHHYTGLIGTSISGAFLYLIGILNVIVLVGIVRVFAHLRRGD----YDEAELEQQLDNRG-LLI

 NixA
 GKNAYGVGFYFSMGHSSVVI---LMTIISAFAIAWAKEH-TPMLEEIGGVVGTLVSGLFLLIIGLLNAIILIDLLKIFKKSHSNESLSRQQNEEIERLLTSRG-LLN

 \*
 .\*
 :\*
 :\*
 :\*
 :\*
 :\*

UrehRMFKRVFNMVNKSWHMYPVGFLFGLGFDTATEIGVLGISAASATHGMNLWSIMVFPILFAAGMALIDSLDNFVMIGAYGWAFSKPVRKLYYNITITAASVIIAFFIGHoxNRIFRPLFRFITRSWHMYPLGMLFALGFDTATEVALLGISTMEASRGVPIWSILVFPALFTAGMALIDTIDSILMCGAYAWAYAKPVRKLYYNMTITFVSAIVALIVGHupNRLLGPMFRLVTKPWHMYPLGFLFGLGFDTATEIGLLSISASEAARGASLADVMVFPALFAAGMALVDTADSTLMVSAYRWAFVDPMRKLWYNLTITGASVAVALFIGNicTRFLGRFTKSLTKSWHMYPVGFLFGLGFDTATEIALLVLAGTSAAAGLPWYAILCLPVLFAAGMCLLDTIDGSFMNFAYGWAFSSPVRKIYYNITVTGLSVAVALLIGNixARFFKPLFNFVSKSWHIYPVGFLFGLGFDTASEIALLALS--SSAIKVSVVGMLSLPILFAAGMSLFDTLDGAFMLKAYDWAFKTPLRKIYYNISITALSVFIALFIG\*:::::\*::\*:::::\*::\*::\*::\*::\*::\*::\*::\*::

UreH	GIEALGLIADKLNLTGGIWTPINNISENLGQIGYWIIGMFICCWLVSIINYYVRGYDKLNISR	_352
HoxN	GIETLGLLADKFMLKGVFWNAVGALNENFCQLGFVIIGIFTVCWVVSIVVYRLRRYDDSEVRA	_351
HupN	GIEALGLIGNRLDLSGGVWTLIDALNESLANVGLAVIALFAIAWLLSIVLYRRLIAGSSGLADTEVLECADATEA	V <sup>381</sup>
NicT	SVELLGLIANQLGWQGPFWDWLGGLDLNTVGFVVVAMFALTWAIALLVWHYGRV-EERWTPAPDRTT	-372
NixA	LIELFQVISEKLHLKFENRLLSTLQSLEFTDLGYYLVGLFVIAFLGSFFLWKIK-FSKLES	_331

FIGURE 2





















FIGURE 5



#### Publication n°3

The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels

and functionnaly interchangeable in vitro with the Helicobacter pylori UreI protein

Florent Sebbane, Stéphanie Bury-Moné, Katia Cailliau, Edith Browaeys-Poly, Hilde De Reuse and Michel Simonet

Accepté dans Molecular Microbiology

# The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionally interchangeable *in vitro* with the *Helicobacter pylori* UreI protein

Florent Sebbane<sup>1</sup>, Stéphanie Bury-Moné<sup>2</sup>, Katia Cailliau<sup>3</sup>, Edith Browaeys-Poly<sup>3</sup>, Hilde De Reuse<sup>2</sup> and Michel Simonet<sup>1, †</sup>.

<sup>1</sup>Inserm E9919-Université JE2225-Institut Pasteur de Lille, Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses, Institut de Biologie de Lille, F-59021 Lille, France. <sup>2</sup>Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France. <sup>3</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille, Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>†</sup>Corresponding author. Mailing address: Département de Pathogenèse des Maladies Infectieuses. Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France.Phone: 33 3 20 87 11 78. Fax: 33 3 20 87 11 83. E-mail: michel.simonet@ibl.fr.

#### Summary

Urea uptake in eukaryotes and prokaryotes occurs via diffusion or active transport across the cell membrane. Facilitated diffusion of urea in both types of organism requires a single-component channel. In bacteria, these transport systems allow rapid access of urease to its substrate, resulting in ammonia production which is needed either for resistance to acidity or as a nitrogen source. In Yersinia pseudotuberculosis, an ureolytic enteropathogenic bacterium, a gene of unknown function (yut) and located near the urease locus was found to encode a putative membrane protein with weak homology to single-component eukaryotic urea transporters. When expressed in Xenopus oocytes, Yut strongly increases cellular permeability to urea. Inactivation of yut in Y. pseudotuberculosis results in diminished apparent urease activity and reduced resistance to acidity *in vitro* when urea is present in the medium. In the mouse model, bacterial colonization of the intestine mucosa is delayed with the Yut-deficient mutant. Although structurally unrelated, Yut and the Helicobacter pylori UreI urea channel were shown to be functionally interchangeable in vitro and are sufficient to allow urea uptake in both bacteria, thereby confirming their function in the respective parent Homologues of Yut were found in other yersiniae, Actinobacillus organisms. pleuropneumoniae, Brucella melitensis, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. The Y. pseudotuberculosis Yut protein is therefore the first member of a novel class of bacterial urea permease related to eukaryotic transporters.

## Introduction

Urea is the main nitrogen catabolite in mammals, which excrete this waste product in their urine and faeces. This molecule is widely spread throughout nature, and represents a suitable nitrogen source for many microbes living in the environment. Indeed, some bacterial species (using cytoplasmic ureases) catalyze hydrolysis of urea to carbonic acid and ammonia – the latter being an efficiently-assimilated source of nitrogen (Mobley *et al.*, 1995). In some micro-organisms, the buffering capacity of ammonia generated by urea hydrolysis serves to generate resistance to acidity (Mobley *et al.*, 1995; Riot *et al.*, 1997; Skouloubris *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Urea uptake favors bacterial survival in these extreme conditions, and thus needs to be very efficient. It was originally thought that rapid movement of urea across cell membranes occurred by passive diffusion, but subsequently facilitated or active urea transport by specialized carriers was demonstrated, both in prokaryotes and eukaryotes (Sands *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1998; Weeks *et al.*, 2000).

Urea transporters have been identified in a number of prokaryotes. In *Escherichia coli*, nonselective uptake of urea occurs through the GlpF ("glycerol facilitator") membrane channel, which allows entry of a variety of polyols and itols, as well as glycine (Heller *et al.*, 1980). More specialized transporters have been reported, and these urea permeases fall into two categories. The first type – described in *Methylophilus methylotrophus* – is a putative ATP-binding cassette (ABC) transporter consisting of at least four proteins (Mills *et al.*, 1998). The second class of urea transport system is a single-component permease allowing diffusion of urea through a channel. The prototype for this sort of channel is the integral membrane protein UreI, described in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* (Weeks *et al.*, 2000). In this organism, the UreI urea channel confers resistance to acidic pH *in vitro* (Skouloubris *et al.*, 1998; Weeks *et al.*, 2000) and is necessary for *in vivo* colonization of the extremely acidic gastric environment (Skouloubris *et al.*, 1998). Subsequently, UreI-like proteins have been found in other ureolytic organisms, such as *Lactobacillus fermentum* (GenBank accession number AF120718), *Streptococcus salivarius* (Weeks and Sachs, 2001) or other *Helicobacter* species e.g. *H. hepaticus* (Beckwith *et al.*, 2001). In this article, we report

the identification and characterization of a novel type of bacterial urea transporter in the enteropathogenic gram negative bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*. This single-component urea transport system (designated Yut) shares subtle structural and sequence homologies with the mammalian urea transporters but differs from the UreI protein in terms of composition and some of its properties.

### **Results**

An open reading frame (yut), contiguous to the Y. pseudotuberculosis urease locus, codes for a protein homologous to mammalian urea transporters.

While sequencing the DNA region situated downstream of the *Y. pseudotuberculosis* 32777 urease locus *ureABCEFGD* (Riot *et al.*, 1997), we found an open reading frame (ORF) separated from the 3'-end of *ureD* by 378 nucleotides (nt). This 993-bp ORF, designated *yut*, codes for a putative, 330 amino acid (AA) product with a calculated molecular mass of 35,039 Da. The corresponding Yut protein shows no significant homology to prokaryotic proteins of known function. Surprisingly, Yut presented a weak homology to eukaryotic urea transporters present in different tissues from various mammalian, fish and amphibian species (Sands *et al.*, 1997), with 21-25% identical residues and 35-38% similar residues. Similarities between Yut and eukaryotic urea transporters as well the association of the *yut* gene with the urease gene cluster of *Y. pseudotuberculosis* prompted us to investigate whether Yut might be an urea transporter. The Yut hydropathy profile suggests that this protein is probably an integral membrane protein comprising ten transmembrane segments with the carboxyl- and aminotermini oriented towards the cytoplasm, together with a central, 30 AA periplasmic loop. These structural features are similar to those of urea transporters from rabbit renal medulla (oUT-A2) (You *et al.*, 1993) and the human erythrocyte (hUT-B1) (Olives *et al.*, 1995). Furthermore, tandem sequence repeats (LPXXTXPF) resembling the signature of eukaryotic urea transporters (Rousselet *et al.*, 1996) were found in Yut, although they were slightly degenerated (Fig. 1). In contrast to the eukaryotic urea transporters, the Yut protein does not possess N-glycosylation or phosphorylation sites, and its sequence is shorter - in particular at its N- and C-terminal extremities.

#### Inactivation of the yut gene reduces apparent urease activity in Y. pseudotuberculosis.

To assess the physiological role of the Yut protein in Y. pseudotuberculosis, a Yut-deficient mutant designated MYUT was engineered from wild type strain 32777. Mutation consisted of the insertion of a kanamycin resistance cassette into yut at nt position 517. Urease activities of crude extracts from the MYUT mutant did not significantly differ from that of a wild type strain, 1.3  $\pm$  0.2 versus 1.2  $\pm$  0.3 µmol NH<sub>3</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein, respectively. When measurements were performed with the supernatants of intact cells incubated for 15 min with 3 mM urea, the apparent urease activity of the Yut-deficient strain was significantly reduced, compared to the parental strain (Fig. 2). The same results were obtained regardless of whether the pH of the incubation medium was 3, 5 or 7. We observed that wild type activity was recovered in a MYUT mutant trans-complemented with an intact copy of vut (Fig. 2). Furthermore, when this mutant was incubated in the presence of high concentrations of urea (30 mM), the apparent urease activity increased to a value close that of the wild type strain 32777 - almost certainly as a result of enhanced urea diffusion (Fig. 2). These data indicated that the Yut membrane protein is necessary to achieve full urease activity in intact Y. pseudotuberculosis cells but not in crude extracts, and that in the mutant strain, urea entry is the limiting factor. This is consistent with Yut being an urea transporter in Y. pseudotuberculosis.

Yut increases the permeability of Xenopus oocytes to urea.

To demonstrate that yut is able to transport urea, we investigated the incorporation of this molecule into cellular systems. In order to overcome the difficulty of assessing urea uptake in bacterial cells (due to the low volume of the latter) (Weeks et al., 2000), we studied accumulation of urea in Xenopus oocytes expressing the Y. pseudotuberculosis Yut protein. Oocytes which were micro-injected with mRNA synthesized in vitro from pFS70 produced a stable, Yut-c-myc hybrid protein over 96 h (data not shown). Positive control oocytes were micro-injected with mRNA specific for the human urea transporter hUT-B1 generated in vitro from plasmid pT7TS-hUT-B1: water-injected oocytes served as negative controls. As shown in Fig. 3, expression of the bacterial protein by oocytes resulted in increased <sup>14</sup>C-urea cellular uptake. Accumulation of this compound did not depend on the temperature at which cells were incubated (13°C, 19°C or 23°C, Fig. 3A). Similar results (not shown) were observed when oocytes were placed in ND96 medium at either pH 7 or 5.5. Moreover, we observed comparable levels of <sup>14</sup>C-urea entry into *Xenopus* oocytes regardless of whether cells were incubated with 1 or 100 mM cold urea or with 100 mM cold thiourea (a urea analog) (Fig. 3B). Therefore, we conclude that Yut performs specific transport of urea into oocytes. Like the urea channel UreI, Yut functionality is temperature-independent and not saturable by urea: in contrast, it is pH-insensitive.

#### Yut is necessary for in vitro resistance to acidity of Y. pseudotuberculosis.

The *yut* mutant's resistance to acidic conditions was examined *in vitro* and compared to that of the wild type strain. Bacteria  $(10^{9.5} \text{ per ml})$  were incubated in citrate buffer at pH 2 in the
presence of 3 mM urea and viable cells were counted on agar after a 90-min incubation. The pH of the medium remained stable over the course of the experiment. Under these conditions, the *yut*-deficient strain was more susceptible to acidic conditions than the wild type strain (mean value of  $log_{10}$  bacterial counts of three separate assays  $\pm$  standard deviation: 2.85  $\pm$  1.20 versus 6.12  $\pm$  0.45). Resistance to acidity was fully restored when mutant MYUT was *trans*-complemented with the wild-type *yut* gene (6.13  $\pm$  0.30).

Yut deficiency in Y. pseudotuberculosis is associated with delayed bacterial colonization of Peyer's patches in a murine model.

Since Yut confers *in vitro* resistance to acidic pH on *Y. pseudotuberculosis*, we therefore sought to determine whether this urea transporter plays a role *in vivo*. We used a murine model of oral infection, counting viable *Yersinia* in the stomach and ileum 90 min after an intra-gastric challenge with a sub-lethal dose  $(10^{7.8} \text{ bacteria})$  of either the MYUT mutant or the wild type strain 32777. We did not observe a statistically significant difference between the two strains, either in the stomach  $(10^{3.3} \pm 10^{2.4} \text{ versus } 10^{5.3} \pm 10^{1.0} \text{ bacteria}$  [means  $\pm$ standard deviations for five animals] for Yut-negative and Yut-positive strains respectively) or for ileum washings  $(10^{3.1} \pm 10^{1.8} \text{ versus } 10^{4.4} \pm 10^{0.7} \text{ bacteria for Yut-negative and Yut$ positive strains respectively). Secondly, we studied*Yersinia*colonization of Peyer's patchesand the spleen by each of the two strains at days 1, 3 and 5 post-challenge. As shown inFigure 4,*yut*inactivation delayed bacterial colonization of the intestinal lymphoid folliclesand consequent spreading of microorganisms to the spleen. Yut and UreI are functionally interchangeable urea transport systems.

We next investigated whether the Y. pseudotuberculosis Yut urea transporter could replace the UreI acid-activated urea channel in H. pylori, and vice versa. First, a UreI-deficient H. pylori strain (N6-834) was transformed with plasmid pFS74 carrying the yut gene (Table 1). In this transformed strain, the kinetics of ammonia production in the extracellular medium were studied following incubation of intact cells in PBS at pH 2.2 with 10 mM urea. As illustrated in Fig. 5, incubation of the H. pylori parental strain N6 resulted in significant and rapid ammonia production, with the pH increasing to 7.1. As previously reported (Bury-Moné et al., 2001), hardly any ammonia is produced by the UreI-deficient strain N6-834 under these conditions, and the final pH is only 3.2. The kinetics of ammonia production with strain N6-834 (pFS74) revealed that the Yut protein is able to trans-complement H. pylori for the lack of UreI. This ammonia production, although slower than that of the parental strain, reached a value of 14 mM after 3 h and raised the pH to 6.6. Survival of the different H. pylori strains incubated in PBS with 10 mM urea for 2 h at pH 2.2 was examined and compared with their survival at pH 7. While viability of the UreI-deficient strain N6-834 was reduced (between 10 and 100 fold), the presence of Yut in the ureI mutant N6-834 (pFS74) completely restored this H. pylori strain's capacity to resist acidic conditions.

We then tested whether UreI could complement the *Y. pseudotuberculosis* Yutdeficient mutant and whether this protein responded to extracellular pH as in *H. pylori*. Plasmid pILL850 (carrying *ureI*, see Table 1) was introduced into the *Y. pseudotuberculosis* mutant MYUT by electrotransformation. The apparent urease activity of supernatants of this transformant strain was measured after incubation at pH 3, 5 or 7 (Fig 2). Most interestingly, the *Y. pseudotuberculosis* mutant MYUT expressing the *H. pylori* UreI protein recovered high urease activity at pH 5 and 3 (Figure 2); however, the UreI channel expressed in *Y*. *pseudotuberculosis* was not open at pH 7, as is the case in its natural genetic background.

## Discussion

In this study, we describe a new prokaryotic urea transporter (designated Yut) encoded by a gene adjacent to the urease locus of *Y. pseudotuberculosis*. The role of Yut in urea uptake was deduced from the following observations. First, inactivation of the *yut* gene in *Y. pseudotuberculosis* results in reduction of the apparent urease activity measured with intact cells, due to a deficiency in the accessibility of its substrate, urea. Second, *Xenopus* oocytes expressing Yut presented a strong increase in urea permeability. Third, urea uptake was restored to *Y. pseudotuberculosis yut* and *H. pylori ureI* mutants by *trans*-complementation with their respective heterologous genes, namely *ureI* and *yut*. Yut selectively transports urea: like UreI, it functions independently of temperature and is not saturable by urea. Consequently, the mechanism of Yut-mediated urea transport is one of channel-mediated diffusion.

Yut has no homology with UreI or UreI-like proteins but shares a weak identity (21 to 25 %) with various mammalian urea permeases. Therefore, Yut represents a novel type of bacterial urea transporter, and database searches revealed that it is not unique to *Y. pseudotuberculosis*. Genes encoding Yut homologues are found in other pathogenic *Yersinia* species such as *Y. pestis* (Yut<sub>p</sub>, > 99% AA identity) (Parkhill *et al.*, 2001) and *Y. enterocolitica* (Yut<sub>ent</sub>, 83% AA identity) (unfinished sequenced genome available at the Sanger Center). Additionally, PCRs with degenerate primers allowed us to detect *yut* homologues in nonpathogenic *Yersinia* species: *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. mollaretii*, and *Y. bercovieri* (unpublished results). We also found uncharacterized *yut*-like genes in phylogenetically distant species such as *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Utp, 28

% AA identity) (Bosse *et al.*, 2001), *Brucella melitensis* (orf BME10642, 46 % AA identity) (DelVecchio *et al.*, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (orf PA1497, 31 % AA identity) (Stover *et al.*, 2000) and *Staphylococcus aureus* (orf SA 2081, 31 % AA identity) (Kuroda *et al.*, 2001). All these putative proteins are encoded by genes present in the vicinity of urease gene clusters (with the exception of *P. aeruginosa*) and contain eukaryotic urea transporter signature sequences within their N- and C- terminal regions, strongly suggesting that they are indeed urea transporters. Comparative analysis of the tandem repeats in Yuts and Yut-like proteins revealed that the motif localized in the N-terminal region is less conserved (Fig. 5). We therefore propose a more general consensus sequence of tandem repeats, i.e. TXPF rather than LPXXTXPF, which would be valid for both prokaryotic and eukaryotic urea channels.

In contrast to UreI, Yut functionality is pH-independent. Because of the very high degree of identity between Yut and its homologues from other pathogenic *Yersinia* species, it can be predicted that  $Yut_p$  and  $Yut_{ent}$  are also pH-insensitive. As is the case for *H. pylori*, acid activation of urease has been reported in *Y. enterocolitica* (Young *et al.*, 1996). However, this activation does not seem to be due to the opening of  $Yut_{ent}$  at acidic pH because a *Y. pseudotuberculosis* MYUT mutant complemented with *yut<sub>ent</sub>* gene did not show acid activation of urease (data not shown).

Like UreI, Yut is responsible for entry of urea into the bacterial cytoplasm, and thus controls the accessibility of substrate to urease. As a consequence, a Yut-deficient *Y*. *pseudotuberculosis* strain displays decreased apparent urease activity and becomes dramatically susceptible to acidity *in vitro*. *Y. pseudotuberculosis* is an entero-invasive bacterium that causes self-limited ileitis and mesenteric lymphadenitis in most cases but has the propensity to spread into deeper tissues (liver, spleen, etc.) via the hematogenous route (Butler, 1983). This pathogen enters the host via the oral route in contaminated food or water: bacterial survival while crossing the stomach is a critical step in the infectious process. In

addition to the stomach, Y. pseudotuberculosis cells also encounter an acidic environment in the small intestine when infection set in (Sleisenger, 1981). In the murine model of oral infection, we were unable to show a significant difference in the number of viable bacteria recovered in stomach and ileum washings from animals after 90 min of infection, regardless of whether Y. pseudotuberculosis expressed Yut or not. Thus, within the limits of this experimental model, a role of Yut in bacterial pathogenicity could not be demonstrated - at least at this very early stage of infection. Subsequent stages of the infectious process (such as colonization of Peyer's patches and the spleen) do, however, appear to be delayed in the Yutdeficient mutant when compared to the wild type. This could indicate a slight reduction in bacterial load in the acidic environment of the digestive tract. This contrasts with the essential role of the H. pylori UreI protein in the stomach colonization of a mouse model (Skouloubris et al., 1998), and is certainly related to the difference in digestive tract tropism between Yersinia, which is enteric, and H. pylori, an exclusively gastric pathogen. Because of these observations coupled with Yut's pH-independent functionality and the presence of yut homologues in nonpathogenic yersiniae, we propose that Yut plays a main role in nitrogen metabolism and also in acidity survival. The importance of urea import in cell physiology is emphasized by our finding on the Y. pseudotuberculosis genome of genes encoding homologues of components of the *M. methylotrophus* ABC urea carrier: the periplasmic binding protein FmD (42 % AA identity) and transmembrane proteins FmdE and FmdF (28 % and 36 % AA identity, respectively) (Mills et al., 1998). Interestingly, mutation of yut reduces but does not abolish urea incorporation into Yersinia cells, as demonstrated by urease assay. These observations suggest that urea can enter into Y. pseudotuberculosis by both passive and facilitated diffusion, and perhaps even active transport.

Although Yut and UreI are unrelated proteins, the two are functionally interchangeable, since urea uptake ability is restored in a UreI-deficient *H. pylori* strain *trans*-

138

complemented with *yut*. Conversely, UreI is functional in *Y. pseudotuberculosis* and is active only at acidic pH, as in its natural genetic background. This indicates that Yut and UreI are necessary and sufficient to allow cellular urea uptake, and their interchangeability suggests that they probably act as single-component channels. These results not only confirm the respective roles of UreI and Yut as urea transporters but also provide a nice example of evolutionary convergence between two unrelated organisms. Yut and UreI have no peptide motifs in common: the question of whether there is a protein conformation characteristic of urea channels could only be answered by determination of Yut and UreI's respective threedimensional structures.

The Yuts and their homologues (Utp, BME10642, PA1497 and SA2081) are at least 50 to 60 amino acids shorter than the eukaryotic transporters. The extension of the eukaryotic urea channels, lying at the N- and C-extremities, contains phosphorylated residues - a post-translational modification known to permit regulation of protein functionality (Zhang *et al.*, 2001). Interestingly, this region can be considered as evidence of strong divergent evolution: the function and signal controls of these urea channels have become adapted to the physiology of the host organism, be it a eukaryote or a prokaryote. Nevertheless, gene acquisition in eukaryotes and prokaryotes could also have resulted from separate, totally independent events.

Only some years ago, the commonly admitted dogma was that urea diffused freely through the bacterial membrane. The recent discovery of bacterial urea transporters has challenged this notion: our discovery of a new family of urea channels related to eukaryotic channels opens up new perspectives on the importance of urea import in bacterial metabolism and pathogenicity.

# **Experimental procedures**

Bacterial strains, plasmids and growth conditions.

The main characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was used as a host for the cloning experiments. *E. coli* strains SY327 $\lambda pir$  and SM10 $\lambda pir$  were recipients for replication of plasmid pCVD442 and its derivatives. *Y. pseudotuberculosis* and *E. coli* strains were grown at 28°C and 37°C respectively, in Luria-Bertani (LB) broth or on agar plates. *H. pylori* was cultivated on blood agar base 2 (Oxoid) supplemented with 10 % defibrinated horse blood plus an antibiotic-fungicide mix, in micro-aerophilic conditions at 37°C. Mating experiments between *E. coli* and *Y. pseudotuberculosis* were plated on M9 minimum medium agar, as previously described (Carnoy *et al.*, 2000). Ampicillin (100 µg ml<sup>-1</sup>), kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup>; 20 µg ml<sup>-1</sup> for *H. pylori*) and sucrose (10%) were added to growth media for bacterial selection when necessary.

#### DNA and gene manipulations.

Standard procedures were used for genomic DNA extraction, small-scale plasmid preparation, endonuclease digestion, DNA ligation, PCR, agarose gel electrophoresis, elution of DNA fragments from agarose gels and *E. coli* transformation (Sambrook and Russel, 2001). Large-scale plasmid DNA preparations were purified on Qiagen columns. Recombinant plasmid DNA was introduced into *Yersinia* and *H. pylori* by electroporation and natural transformation respectively (Conchas and Carniel, 1990; Chevalier *et al.*, 1999). Southern blots

were performed following standard procedures, using a digoxigenin-labeled probe and the DIG detection kit from Roche.

To obtain the *Y. pseudotuberculosis yut* mutant, the products of allelic exchange through homologous recombination were selected after mating of *Y. pseudotuberculosis* parental 32777 with the *E. coli* SM10 $\lambda$ pir (pFS23). This mutant strain was designated MYUT and its genotype was confirmed by PCR assays and Southern blot hybridization with appropriate DNA probes (data not shown).

#### Oligonucleotide primers.

Thirteen primers were synthesized (Sigma) for PCR generation of DNA fragments to be cloned or used as probes. Their nucleotide sequences  $(5'\rightarrow3')$  were as follows: U1:GCAGCTTCAAGTAGAAGGG; U2:TAAAACGGTGCCGGTAATC; U3:GAT TACCGGCACCGGTTTTA; U4:TCAACCCTACCCGTTCTGAC; U5:CGCCCAAAGA ACATCATG U6:ACGGATCCAGAAGGGTAAAATAATGAATGCTAAAACAGTCAACA AATC; U7:GTCGATATCTACTGTCGGTGCTCTGGCA; U8:GACGGATCCATGAATGC TAAAACAGTCAAC; U9:CTGTTCGAAACTGTCGGTGCTCTGGCATGAC; U10:TATCA GCCAGTGATCCAAGCA; U11:GGTGATAGTGATATTGTAA; K1:GCTCTGAATTCGA TATCGGGGAAAGCCACGTTGTGTC; K2:GATTGGAATTCGATATCCTGAGGTCTGC CTC GTGAAGAA.

Yut expression in Xenopus laevis oocytes.

The *yut* gene was cloned into pCS2+MT, a vector allowing *in vitro yut* mRNA synthesis and translation of a fusion between Yut and the c-myc epitope (Roth *et al.*, 1991). The resulting

141

plasmid was named pFS70. Plasmids pFS70 and pT7TS-hUT-B1 (Sidoux-Walter *et al.*, 1999) were linearized with *NcoI* and *SmaI* endonuclease respectively, and then purified. Capped mRNAs were transcribed from linearized plasmids with the SP6 mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion). Expression studies were carried out by microinjection of mRNAs (60 ng in 60 nl) into the equatorial region of *X. laevis* oocytes (pre-treated with collagenase A) in ND96 medium supplemented with antibiotics and soybean trypsin inhibitor, as described elsewhere (Browaeys-Poly *et al.*, 2000). Oocyte expression of Yut-c-myc fusion was assessed by Westernblotting cellular extracts with a MAb specific for the human c-myc proto-oncogene product (Evan *et al.*, 1985).

#### Oocyte urea transport activity.

Two or three days after microinjection, urea transport into groups of 5-6 oocytes was measured with [ $^{14}$ C]-urea. The assay was initiated by resuspending individual oocytes into 0.2 ml of ND96 medium containing either cold urea (1 or 100 mM) or 100 mM cold thiourea (Sigma) in the presence of 40  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-labeled urea (2 $\mu$ Ci per ml; Amersham). Three hours later, oocytes were washed three times with ND96 medium containing cold urea. Individual oocytes were then lysed with 10% SDS, and mixed with 4 ml of scintillation solution (Aquasafe 300 plus, Zinsser Analytic). Oocyte-associated radioactivity was determined in a Beckman LS6000SC counter.

#### Determination of urease activity.

*Y. pseudotuberculosis* urease activity was measured from stationary growth phase cultures in LB broth, either on crude cell extracts obtained after bacterial disruption by a French press or

on intact *Yersinia* cells (Young *et al.*, 1996; McGee *et al.*, 1999). Enzyme activity was assessed by measuring the amount of ammonia released from urea (50 mM for cell extracts; 3 and 30 mM for intact cells) in 0.1 M citrate buffer after a 15-min incubation period: the ammonia was detected using a colorimetric assay based on the phenol-hypochlorite reagent (McGee *et al.*, 1999). Urease specific activity was expressed in micromoles of NH<sub>3</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein (for crude extract) and picomoles of NH<sub>3</sub> min<sup>-1</sup> log<sub>10</sub> cfu<sup>-1</sup> (for intact cells). For intact *H. pylori* cells (10<sup>7</sup> per ml) ammonia production was measured from a 48-hr (stationary growth phase) culture as previously described (Bury-Moné *et al.*, 2001).

#### In vitro assay of survival to acidity.

Bacterial resistance to acidic conditions was examined using stationary growth phase *Y*. *pseudotuberculosis* cultures. *Yersinia* cells were pelleted by centrifugation and resuspended in pre-warmed ( $37^{\circ}$ C) citrate buffer (pH 2 with 3 mM urea) to a concentration of  $10^{9.5}$  cells per ml. Viable bacteria were counted after a 90-min incubation. For the *H. pylori* survival assay, 48-hr cultures were used: after a 2 hr incubation at pH 2.2 in the presence of 10 mM urea, viable bacteria were counted and their number compared to that of bacteria incubated in the same medium at pH 7.

#### Mouse experimental infection

Six week-old, female, outbred OF-1 mice (Iffa Credo) were starved for 18h and then challenged using a gastric tube with 0.2 ml of bacterial suspension in sterile, distilled water. Bacterial inoculums were prepared from 36h cultures in LB at 28°C. The cultures were

centrifuged, and bacterial pellets were washed once and resuspended in distilled water. Animals were kept in positive-pressure cabinets during experimentation.

Bacterial growth in mice was assessed at different post-challenge time points. Following sacrifice, the stomach, spleen and three Peyer's patches were removed and homogenized in sterile PBS (for spleen and Peyer's patch samples) or citrate buffer pH 7 (for stomach samples). A 10-cm portion of ileum was flushed three times with 1 ml of sterile citrate buffer. Bacterial counts were obtained by spreading dilutions of organ/tissue homogenates and ileum washings on LB agar containing vancomycin (as *Yersinia* species are naturally resistant to this antibiotic).

Nucleotide sequence accession number.

The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession n° AF412328).

## References

Beckwith, C. S., McGee, D. J., Mobley, H. L., and Riley, L. K. (2001) Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. *Infect Immun* **69**: 5914-5920.

Bosse, J. T., Gilmour, H. D., and MacInnes, J. I. (2001) Novel genes affecting urease acivity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: 1242-1247.

Browaeys-Poly, E., Cailliau, K., and Vilain, J. P. (2000) Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase C-gamma. *Eur J Biochem* **267**: 6256-6263.

Bury-Moné, S., Skouloubris, S., Labigne, A., and De Reuse, H. (2001) The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol Microbiol* **42**: 1021-1034.

Butler, T. (1983) Plague and other Yersinia infections. New York: Plenum Press.

Carnoy, C., Mullet, C., Muller-Alouf, H., Leteurtre, E., and Simonet, M. (2000) Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun* 68: 2553-2559.

Chen, Y. Y., Weaver, C. A., and Burne, R. A. (2000) Dual functions of *Streptococcus* salivarius urease. *J Bacteriol* **182**: 4667-4669.

Chevalier, C., Thiberge, J. M., Ferrero, R. L., and Labigne, A. (1999) Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol* **31**: 1359-1372.

Conchas, R. F., and Carniel, E. (1990) A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene* 87: 133-137.

DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T. *et al.* (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 443-448.

Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59:** 4310–4317.

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product. *Mol Cell Biol* 5: 3610-3616.
Heller, K. B., Lin, E. C., and Wilson, T. H. (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144: 274-278.

Heuermann, D., and Haas, R. (1998) A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet* **257**: 519-528.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I. *et al.* (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225-1240.

McGee, D. J., May, C. A., Garner, R. M., Himpsl, J. M., and Mobley, H. L. (1999) Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* **181**: 2477-2484.

Miller, V. L., and Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583.

Mills, J., Wyborn, N. R., Greenwood, J. A., Williams, S. G., and Jones, C. W. (1998) Characterisation of a binding-protein-dependent, active transport system for short-chain amides and urea in the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. *Eur J Biochem* **251**: 45-53.

Mobley, H. L., Island, M. D., and Hausinger, R. P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59: 451-480.

Olives, B., Mattei, M. G., Huet, M., Neau, P., Martial, S., Cartron, J. P., and Bailly, P. (1995) Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. *J Biol Chem* **270**: 15607-15610.

Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B. *et al.* (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**: 523-527.

Riot, B., Berche, P., and Simonet, M. (1997) Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun* **65**: 1985-1990.

Roth, M. B., Zahler, A. M., and Stolk, J. A. (1991) A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J Cell Biol* 115: 587-596.
Rousselet, G., Ripoche, P., and Bailly, P. (1996) Tandem sequence repeats in urea transporters: identification of an urea transporter signature sequence. *Am J Physiol* 270: F554-555.

Sambrook, J., and Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sands, J. M., Timmer, R. T., and Gunn, R. B. (1997) Urea transporters in kidney and erythrocytes. *Am J Physiol* 273: F321-339.

Sebbane, F., Devalckenaere, A., Foulon, J., Carniel, E., and Simonet, M. (2001) Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene. *Infect Immun* **69**: 170-176

Sidoux-Walter, F., Lucien, N., Olives, B., Gobin, R., Rousselet, G., Kamsteeg, E.J. *et al.* (1999) At physiological expression levels the Kidd blood group/urea transporter protein is not a water channel. *J Biol Chem* **274**: 30228-30235.

Simon, R., U. Priefer, and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784–791.

Skouloubris, S., Thiberge, J. M., Labigne, A., and De Reuse, H. (1998) The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 66: 4517-4521.

Sleisenger, M.H. (1981) Pathophysiology of the gastro-intestinal tract. In *Pathophysiology: the Biological Principles of Disease*. Smith, L. H., and Thier, S. O. (eds). Philadelphia: Saunders, pp. 1526-1537.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J. *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Taylor L.A., and Rose R.E. (1988) A correction in the nucleotide sequence of the *Tn903* kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res* **16**: 358.

Vieira, J., and Messing J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19:** 259–268.

Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., and Sachs, G. (2000) A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**: 482-485.

Weeks, D. L., and Sachs, G. (2001) Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **40**: 1249-1259.

You, G., Smith, C. P., Kanai, Y., Lee, W. S., Stelzner, M., and Hediger, M. A. (1993) Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature* **365**: 844-847.

Young, G. M., Amid, D., and Miller, V. L. (1996) A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol* **178**: 6487-6495.

Zhang, C., Sands, J. M., and Klein, J. D. (2001) Vasopressin rapidly increases the phosphorylation of the UT-A1 urea transporter in rat IMCDs through PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* **8**: 8.

#### Acknowledgments

F. Sebbane received a doctoral studentship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur,de la Recherche et de la Technologie and from the Fondation pour la Recherche Médicale.This work was supported in part by the European Regional Development Fund. We thank J.-P. Bohin, J.-P Vilain and C. Wychowski for their advice, P. Bailly and D.L Shi for supplying

plasmids pT7TS/hUT-B1 and pCS2+MT, C. Mullet for technical assistance and N. de Finance for her help with the *H. pylori* experiments.

#### **FIGURE LEGENDS**

**Fig. 1.** Alignments of tandem repeats of eukaryotic and prokaryotic urea transporters. RS; repeated sequences.

**Fig. 2.** Impact of Yut on *Y. pseudotuberculosis* urease activity. Apparent enzyme activity (expressed as pmol of  $NH_3 min^{-1} \log_{10} CFU^{-1}$ ) was measured for supernatants of intact *Y. pseudotuberculosis* cells (5.10<sup>6</sup> per ml) incubated in the presence of 3 mM urea at pH 3, 5 and 7. Each bar is the mean value of three separate assays  $\pm$  SD. Black bar, wild type strain 32777; white bar, isogenic mutant MYUT; grey bar, mutant MYUT complemented with plasmid pFS44 carrying the *Y. pseudotuberculosis yut* gene; hatched bar, mutant MYUT complemented with plasmid pILL850 carrying the *H. pylori ureI* gene.

**Fig. 3.** <sup>14</sup>C-urea uptake in *X. laevis* oocytes injected with *yut* mRNA. Panel A. Urea uptake by oocytes was assessed after a 3 hr incubation at different temperatures in ND96 medium (pH 7) containing 1mM urea, of which 40  $\mu$ M were radiolabeled. Panel B. Urea uptake by oocytes was assessed after a 3 hr incubation at 19°C in ND96 medium (pH 7) containing 40  $\mu$ M radiolabeled urea plus 100 mM cold thiourea or urea. Experiments were performed twice and representative data are shown. Each bar is the mean value for 5-6 oocytes  $\pm$  SD. Black bar: oocytes injected with *yut* mRNA; white bar, water-injected oocytes (negative control).

**Fig. 4.** Virulence of the Yut-deficient mutant in mice. OF-1 mice were given 10<sup>7.8</sup> *Yersinia* bacteria via the intragastric route. Bacterial counts in Peyer's patches and the spleen were determined on days 1, 3 and 5 post-challenge. Minimal detection limits were 20 CFU for

Peyer's patches and 60 CFU for the spleen. Each data point shows bacterial counts in tissues from individual animals and each bar represents the mean value for seven mice. O, wild type; • mutant.

**Fig. 5.** Kinetics of extracellular ammonia production by *H. pylori* expressing the *Y. pseudotuberculosis yut* gene. *H. pylori* cells ( $10^8$  per ml) were incubated in PBS (pH 2.2) containing 10mM urea for 3 h, and ammonia release was quantified at various time intervals. Each time point is the mean value of at least four independent assays  $\pm$  SD. The final pH of the medium after a 3 h incubation is indicated at the end of each curve.

*ureI*-deficient *H. pylori* strain N6-834, *trans*-complemented with the *yut* gene from *Y. pseudotuberculosis* (plasmid pFS74) ; ——: *H. pylori* wild type strain N6 (positive control); — – : *ureI*-deficient *H. pylori* mutant N6-834 (negative control).

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or origin
Strains Yersinia pseudotuberculosis 32777 MYUT	wild type strain derived from strain 32777, yutΩaphA-1a	Sebbane <i>et al</i> (2001) This work
Helicobacter pylori N6 N6-834	wild-type strain derived from strain N6, $\Delta ureI\Omega aphA-3$	Skouloubris <i>et al</i> (1998) Skouloubris <i>et al</i> (1998)
Escherichia coli DH5α SY327λpir SM10λpir	supE, $\Delta lacU169$ ( $\phi$ 80lac Z $\Delta M15$ ), hsdR, recA, endA, gyrA, hri, relA $\Delta$ (lac pro) argE (Am) recA rif nalA $\lambda pir$ ; host for pCVD442 and derivatives thi thr leu sup tonA lacY recA::RP4-2Tc::MuKm $\lambda pir$ ; host for pCVD442 and derivatives	Invitrogen Miller and Mekalanos (1988) Simon <i>et al</i> (1983)
Plasmids pZero2-1 pUC18 pUC4K pCVD442 pHe12 pCS2+MT pMS89 pFS19 pFS20 pFS21 pFS22 pFS23 pFS70 pFS74	cloning vector; Km cloning vector; Km plasmid vector; Km ; source of aminoglycoside phosphotransferase <i>aphA-1a</i> gene suicide vector containing the counter-selectable marker <i>sacB</i> ; Ap shuttle cloning vector; Cm expression vector for <i>in vitro</i> RNA synthesis; source of c-myc tag; Ap pHC79Ω, ~35-kb <i>Sau</i> 3A DNA fragment from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777 containing the urease locus and its flanking regions. pUC18Ω, 0.5-kb <i>Eco</i> RI/ <i>XbaI</i> PCR-generated fragment with primer set U1-U2 encompassing 5' end of <i>yut</i> gene from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777 pZero2-1Ω, ~0.6-kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI PCR-generated fragment with primer set U3-U4 encompassing 3' end of <i>yut</i> gene from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777 pFS20Ω, ~0.5-kb <i>Eco</i> RI/ <i>XbaI</i> insert from pFS19 pFS21Ω, ~1.3-kb <i>Eco</i> RI PCR-generated fragment with primer set U1-U4 containing <i>yut</i> Ω <i>aphA-1a</i> insert from pFS22 pCS2+MTΩ, ~1.0-kb <i>Bam</i> HI/ <i>Csp</i> 451 PCR-generated fragment with primer set U8-U9 containing <i>yut</i> gene from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777 pHe12Ω, ~1.0-kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eso</i> RV PCR-generated fragment with primer set U6-U7 containing <i>yut</i> gene from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777 pHe12Ω, ~1.0-kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eso</i> RV PCR-generated fragment with primer set U6-U7 containing <i>yut</i> gene from <i>Y. pseudotuberculosis</i> 32777	Invitrogen Vieira and Messing (1982) Taylor and Rose (1988) Donnenberg and Kaper. (1991) Heuermann and Haas (1998) Roth <i>et al</i> (1991) Miller and Mekalanos (1988) This work This work This work This work This work This work This work
pFS44 pILL850 pT7TS-h-UTB1	pUC18s2, 1.7-Ko blunt end PCK-generated fragment with primer set US-U4 encompassing yul gene from 1. pseudotuberculosis $32777$ pHel2 $\Omega$ , ~1.2-kb insert containing <i>urel</i> gene from <i>H. pylori</i> pT7TS containing the cDNA of human urea transporter hUT-B1	Skouloubris <i>et al</i> (1998) Sidoux-Walter <i>et al</i> (1999)

<sup>a</sup> Ap, Cm, and Km, resistance to ampicillin, chloramphenicol and kanamycin, respectively.  $\Omega$ , *in vitro* insertion.

<b>Figure</b>	l
---------------	---

		RS1	RS2
Щ	hUT-A1	<sup>223</sup> ALNSIFSKWDLPVFTLPENIAVTLYLAA <sup>250</sup>	<sup>685</sup> ALGTIFSKWDLPVFTLPFNITVTLYLAA <sup>712</sup>
EUKARYO	oUT-A2	<sup>162</sup> ALGTIFSKWDLPVFTLPFNIAVTLYLAA <sup>189</sup>	<sup>324</sup> ALTNVLSVFG <mark>LP</mark> TCTWPFCISALIFLLL <sup>351</sup>
	mUT-A3	<sup>232</sup> ALSTIFAKWDLPVFTLPFNIALTLYLAA <sup>259</sup>	ALSNTMAVVGVPSGTWAFCLSTLTFLLL <sup>421</sup>
	rUT-A4	<sup>231</sup> ALSTVFAKWDLPVFTLPENIALTLYLAA <sup>258</sup>	<sup>393</sup> ALSNMMAVVGVPPGTWAFCLSTLTFLLL <sup>420</sup>
	hUT-B1	<sup>163</sup> ALNSMLSKWDLPVFTLPFNMALSMYLSA <sup>190</sup>	GMANFMAEVGLPACTWPFCLATLLFLIM <sup>352</sup>
	rUT-B2	<sup>160</sup> ALSSLFSKWDLPVFTLPFNMALSLYLPA <sup>187</sup>	CMTHLMAAVHLPACTWSFCLATLLFLLL <sup>349</sup>
BACTERIA	Yut	<sup>129</sup> CIADILKTWKVAALTAPFVLTTWVVLLA <sup>156</sup>	<sup>293</sup> ALNTLLLPIGIPTLTMPFVLASWLFLVP <sup>320</sup>
	$\mathtt{Yut}_{\mathtt{p}}$	<sup>129</sup> CIADILKTWKLAALTAPFVLTTWVVLLA <sup>156</sup>	<sup>293</sup> ALNTLLLPIGIPTLTMPFVLASWLFLVP <sup>320</sup>
	Yut <sub>ent</sub>	<sup>129</sup> CIADILKTWKVAALTAPFVLTTWMILLA <sup>156</sup>	ALNILLSPIGIPTLTMPFVLASWLFMVP <sup>319</sup>
	SA2081	<sup>105</sup> AVREVLRPYKVPMLTMPFVIVTWFTILL <sup>132</sup>	<sup>265</sup> GTTTLLEPFG <mark>LP</mark> ALTLPFIIVTWILLFA <sup>292</sup>
	PA1497		<sup>257</sup> ALQPLFGLLG <mark>LP</mark> ALTAPFILACLLCIGG <sup>284</sup>
	BMEI0642	AVSKIMKTWDAPALTFPFVLTTWFLVLA <sup>154</sup>	<sup>291</sup> AMDVALTPLGIPTFTAPFVFVTWLFLLP <sup>318</sup>
	Utp	<sup>105</sup> LIMREFTKRNKIAF <b>T</b> FPFVFTCWIFCGA <sup>132</sup>	<sup>253</sup> LIQFSISSLGIPSYTIGFIIASWLLLAV <sup>280</sup>

**Fig 1.** Alignements of tandem repeats of eucaryotic and procaryotic urea transporters. RS, repeated sequences.



Figure 2

.

Figure 3



Figure 4

**R**1



156

Figure 5



157

R1

# Discussion

# et

# Perspectives



**Figure 12.** Organisation génétique du locus uréase de *Y. pseudotuberculosis*. Les gènes de structure et auxiliaires sont représentés respectivement en dégradé gris et jaune ; les gènes impliqués dans le transport du nickel sont représentés en dégradé vert. Le gène *yut* code un transporteur d'urée. La taille des gènes ainsi que les espacements inter-géniques n'ont pas été respectés.

# I. L'environnement des gènes *ure* de structure et auxiliaires des Yersinia

Le locus uréase de Y. pseudotuberculosis est constitué de trois gènes de structure ureABC et de quatre gènes auxiliaires ureEFGD, tous transcrits dans la même direction [354]. Nos travaux ont montré que chez cette espèce, ce locus est précédé par les gènes yntABCDE codant un transporteur de nickel de type ABC et, est suivi successivement par les gènes yut et ureH spécifiant respectivement un transporteur d'urée et un transporteur de nickel (publications n°2 et 3) (Figure 12). Ces gènes qui, mentionnons-le ont la même polarité que ureABCDEFGD, peuvent être assimilés à des gènes auxiliaires puisqu'ils participent à l'uréolyse. Ils sont présents et arrangés d'une manière identique sur le chromosome de Y. pestis et Y. enterocolitica (publications n°2 et 3) mais aussi des autres espèces uréolytiques du genre, Y. frederiksenii, Y. intermedia, Y. kristensenii, Y. mollaretti, Y. bercovieri, Y. aldovae, Y. rodhei (résultats personnels non rapportés). Compte tenu de la longueur des espaces intergéniques, les gènes ure, ynt et yut sont très probablement organisés en plusieurs unités transcriptionnelles. Plus particulièrement, les gènes ureABCEFGD et yntABCDE forment des unités polycistroniques (ureABC, ureEFGD et yntABCDE).

La configuration de *ynt*, *yut* et *ureH* est à la fois consensuelle et unique eu égard aux autres bactéries uréolytiques. Un gène codant un transporteur d'urée est également présent a proximité du locus uréase de *A. pleuropneumoniae*, *B. melitensis* et *S. aureus*, mais en amont de celui-ci contrairement à *yut*. Des gènes de transport de nickel précèdent le locus uréase de *Bacillus* sp. TB-90 [243], *V. parahaemolyticus* [306], *A. pleuropneumoniae* [305] et *E. coli* ou, au contraire, lui succède comme chez *H. hepaticus*; toutefois dans aucun cas, sauf *Yersinia*, deux systèmes génétiques codant des transporteurs de nickel encadrent ce locus.

Il convient de mentionner que chez certaines espèces bactériennes, le locus uréase et les gènes de transport du nickel sont présents sur des éléments génétiques mobiles : un îlot de pathogénicité dans le cas de *V. parahaemolyticus* où une copie de la séquence d'insertion IS-*VA2* précède les gènes *nik* [306] ; un plasmide, pour les souches uréolytiques de *E. coli* (publication n°2). Par ailleurs, nous avons constaté que les gènes *oxd6-abcde* de *S. enterica*, dont les produits sont identiques à près de 70% aux protéines YntABCDE de *Y. pseudotuberculosis*, sont situés à proximité de gènes spécifiant des ARN de transfert qui sont fréquemment des sites d'intégration d'éléments génétiques mobiles. Enfin chez *Y. pestis*, mais pas chez *Y. pseudotuberculosis*, une copie de la séquence d'insertion IS285 est insérée devant *yntA*. Toutes ces données rendent compte de la plasticité des régions génomiques comprenant le locus uréase. Ainsi, les divergences d'arrangement des gènes codant les transporteurs d'urée ou de nickel au locus uréase entre différents organismes pourraient être expliquées par des événements de recombinaison qui surviendraient pendant et après des transferts interbactériens de matériel génétique.

Il est ainsi possible que les *Yersinia* aient acquis au cours de l'évolution des gènes exogènes contribuant à la dégradation de l'urée. La plus faible teneur en GC (34%) de la région (1 kb) chromosomique séparant les gènes *ureA* et *yntE* que le restant du génome de *Y. pseudotuberculosis* (47%) est un argument qui renforce cette idée. Néanmoins, la conservation de l'organisation génétique du locus uréase chez toutes les espèces de *Yersinia* ainsi que la proportion en GC de la région (environ 14 kb) recouvrant les gènes *ynt* à *ureH* voisine de celle du génome entier (48%), sont deux observations qui nous laissent penser que ce transfert génétique (s'il est bien survenu) se serait produit il y a très longtemps. Bien que cette région semble relativement stable, la comparaison du locus chromosomique de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* comportant les gènes *ure, yut* et *ynt*, nous a permis d'identifier deux évolutions majeures dans celui-ci. La première est l'insertion d'une guanine dans le gène

*ureD* de *Y. pestis* ; la deuxième, l'absence d'un motif de 179 pb chez *Y. pestis*, entre *ureD* et *yut*, alors que cette séquence est présente chez *Y. pseudotuberculosis*.

Nous avons clairement démontré que l'absence d'uréolyse chez Y. pestis résultait d'une mutation ponctuelle dans *ureD* : une insertion d'une guanine dans une étendue de guanines (publication n°1). UreD est, comme nous l'avons déjà mentionné, une protéine chaperon dont l'interaction avec l'apoenzyme est indispensable pour que le nickel soit incorporé dans le site catalytique de l'uréase et qu'il y ait donc activation de l'apoenzyme. Plusieurs rapports avaient signalé l'existence de souches de Y. pestis capables (spontanément ou non) d'hydrolyser l'urée et nous avons pu également sélectionner, avec une fréquence relativement élevée (10<sup>-4</sup> à 10<sup>-5</sup>), de tels mutants (publication n°1). Ces mutants uréolytiques ont perdu la guanine supplémentaire située dans le gène ureD de la souche sauvage (6G au lieu de 7G). Ainsi, le locus uréase de Y. pestis est encore aujourd'hui soumis à une variation génétique rapide. La détection de la mutation inverse (6G vers 7G), en recourant à la fusion traductionnelle de *ureD* et d'un gène rapporteur (gène de résistance à la kanamycine ou à la gentamicine), a malheureusement échoué car la protéine chimère n'était pas fonctionnelle. La réversion de la mutation est pourtant plus que probable : en effet, Y. pestis est un clone qui a naturellement emergé de Y. pseudotuberculosis. Il convient de mentionner que la guanine supplémentaire dans *ureD* a été mise en évidence chez plusieurs isolats cliniques de Y. pestis sans lien épidémiologique apparent. Ceci signifie que soit l'ancêtre commun de ces souches possédait déjà cette insertion, soit, sous l'effet d'une pression évolutive, cette guanine a été insérée dans le gène ureD de toutes les souches de Y. pestis après la spéciation. Cette convergence évolutive découlerait de la nécessité absolue, pour la bactérie, de ne pas hydrolyser l'urée au cours de son cycle de vie. Dans ce cas, la mutation systématiquement dans le gène ureD se ferait toujours par le même mécanisme. Nos travaux ont révélé, chez plusieurs mutants uréolytiques sélectionnés à partir de deux souches indépendantes, la

délétion du nucléotide supplémentaire dans *ureD* à haute fréquence  $(10^{-4} \text{ à } 10^{-5})$ . La suppression de la guanine se ferait donc par un mécanisme généralisé et spécifique.

La délétion ou l'insertion d'un ou plusieurs nucléotides dans un homo-polymère de nucléotides est un événement génétique très répandu dans le monde vivant [355]. La mutation conduit à une variation de l'expression d'un gène ou de la séquence de son produit si elle survient dans la région promotrice (modification de la transcription) ou dans le gène lui-même (modification du cadre de lecture). Les régions chromosomiques qui comportent ces régions de répétition sont fréquemment à l'origine d'erreurs d'appariement des brins d'ADN survenant transitoirement lors de la réplication du génome. Ce processus, qui est dénommé par les Anglo-saxons « slipped-strand mispairing » (glissement dû à un mauvais appariement des brins d'ADN), est indépendant du système de réparation RecA [355]. Les erreurs ont lieu le plus souvent dans des régions d'ADN composées généralement d'une étendue de polypurine et/ou poly-pyrimidine qui assure la formation d'une structure dans laquelle 3 brins d'ADN sont appariés et un brin reste libre [355]. Le brin d'ADN non apparié favoriserait le glissement [355]. La protéine Lrp, qui est produite en très grande quantité (2.500 molécules par cellules en phase exponentielle de croissance), participe au maintien de la structure et de l'organisation du chromosome de E. coli [356]. Un gène homologue au gène lrp de E. coli est présent chez Y. pestis [26] et son produit partage 90% d'identité avec celui de E. coli. Il est intéressant de noter que des séquences homologues aux sites de fixation de la protéine Lrp de E. coli (TTTATTCtNaAT) sont présentes en amont de l'étendue de guanines du gène ureD (TTTATTCCTCTC; TTTATTAACGCC). Sept autres sites putatifs de fixation de Lrp ont été également identifiés dans le locus uréase de Y. pestis et trois d'entre eux sont situés dans la région promotrice. Compte tenu du rôle que joue Lrp dans la conformation du chromosome, il est possible que cette protéine « nucléoïde » puisse participer au processus de « slippedstrand mispairing » et conduire à la délétion d'une des sept guanines dans le gène *ureD* de Y.



# Yp ATTGAATAGAGCTGGGTACCCAGCCTCGTTTATCA

Figure 13. Représentation des régions répétées situées en aval du gène *ureD* de *Y. pseudotuberculosis* (Ypst) et *Y. pestis* (Yp). Les séquences répétées directes sont encadrées et les séquences répétées inversées figurent sur un fond grisé. Les flèches indiquent l'orientation des séquences.

*pestis*. La mutagenèse de l'un ou des deux sites putatifs de fixation de Lrp présents dans *ureD* et/ou l'inactivation du gène *lrp* permettraient de vérifier cette hypothèse.

Nous avons observé que Y. pestis se distingue également de certaines souches de Y. pseudotuberculosis par l'absence d'une séquence de 179 pb entre les gènes *ureD* et *yut*. Chez Y. pseudotuberculosis, cette séquence est encadrée par des motifs nucléotidiques identiques et orientées dans le même sens ; ceux-ci sont eux-mêmes constitués de motifs nucléotidiques identiques, orientés en sens inverse (Figure 13). Chez Y. pestis, la délétion des 179 pb résulterait d'une recombinaison moléculaire homologue entre ces séquences. La persistance d'une des séquences répétées chez Y. pestis renforce cette hypothèse. Cette délétion a été trouvée systématiquement chez toutes les souches testées de Y. pestis et dans certaines souches de Y. pseudotuberculosis incluant celles du sérotype I (Tableau 3) dont Y. pestis dérive. Là encore, il est impossible de préciser si chez Y. pestis l'évènement de recombinaison ayant abouti à la délétion de cette région de 179 pb est antérieur ou non à la spéciation.

### II. Les transporteurs de nickel

Le rôle des gènes *ynt* et *ureH* dans le transport du nickel a été déduit des observations expérimentales suivantes : 1) la restauration de l'entrée du nickel chez un mutant (*nikA*) de *E. coli* par apport, en *trans*, des gènes *yntABCDE* ou *ureH*, 2) la réduction de l'incorporation de l'ion Ni<sup>2+</sup> par *Y. pseudotuberculosis* après inactivation des gènes *yntABCDE* ou *ureH* (publication n°2). Ynt, qui joue un rôle majeur dans le transport du nickel chez *Yersinia*, présente de faibles similitudes (28 à 37%) avec les transporteurs de nickel de type ABC de la famille Nik. En revanche, des protéines fortement similaires à Ynt ont été identifiées non seulement chez *Y. pestis* (99%) et *Y. enterocolitica* (91%) mais également chez *S. enterica*  Tableau 4. Activité uréolytique de souches de Y. pseudotuberculosis présentant ou non la délétion de

Souche	Délétion d'ADN	Uréolyse
2777	non	100% <sup>(a)</sup>
1924/95	non	80%
9314/74	non	74%
2666	oui	14%
YPT12	oui	11%
304/89	oui	3%

179 pb entre ureD et yut

<sup>a</sup>, L'activité enzymatique a été estimée par rapport à celle de la souche de 32777 utilisée comme témoin (100%).

(62%) et *E. coli* (souches uréolytiques, 70%). Il convient de remarquer que Ynt est aussi très apparenté au transporteur de dipeptides Dpp de *S. pyogenes* (39%). Le transporteur de nickel des *Yersinia* pourrait ainsi contribuer au transport de peptides seuls et/ou de peptides riches de résidu histidyl auxquels serait fixé le nickel. La construction d'un arbre phylogénétique à partir de la séquence de la protéine périplasmique des transporteurs de nickel de type ABC décrits à ce jour nous a permis d'établir que ceux-ci peuvent être classés dans deux catégories. La première sous-classe regroupe les transporteurs de *E. coli*, *V. parahaemolyticus* et *B. suis* ; la seconde, ceux des *Yersinia*, *S. enterica* et *E. coli* uréolytiques.

Le faible degré de conservation des protéines membranaires et périplasmiques du transporteur Ynt et des transporteurs de nickel de type ABC des autres espèces bactériennes laisse penser que la spécificité de ces protéines vis-à-vis du cation ne dépend pas de leur séquence primaire mais plutôt du positionnement dans l'espace des différents domaines qui les composent. Cette hypothèse est supportée par les données d'études cristallographiques de protéines périplasmiques de plusieurs transporteurs de type ABC montrant que des molécules dont les structures tridimensionnelles sont voisines ont en fait des structures primaires très peu similaires [308].

UreH intervient pour près de 30% dans le transport intracellulaire du nickel mais, de façon surprenante, contribue seulement à 1% de l'activité uréolytique de la bactérie. Dans le but de proposer un rôle plus conséquent de *ureH* dans l'uréolyse, nous avons émis l'hypothèse que UreH, s'ouvrirait à pH acide, permettant une incorporation rapide de l'ion Ni<sup>2+</sup> dans le cytoplasme de la bactérie et, de ce fait, participerait à l'activation du stock cellulaire d'apoenzyme (cf. régulation par le nickel). En augmentant l'activité uréolytique de la bactérie lors d'un choc acide, UreH contribuerait à la survie de la bactérie dans une telle condition. Des essais comparatifs de résistance à l'acidité de bactéries parentales et mutées dans *ureH*, en présence de concentrations variables de nickel, n'ont malheuresement pas confirmé notre

hypothèse de départ (résultats non publiés). Le rôle de UreH dans la physiologie de Y. *pseudotuberculosis* reste donc indéterminé.

## III. Le transporteur d'urée Yut

Nos travaux ont montré que Yersinia produit un transporteur d'urée, Yut, sans aucune parenté avec le canal UreI de *H. pylori* où ses homologues présents dans chez les autres *Helicobacter*, *S. salivarius* et *L. casei* (publication n°3). En revanche, Yut présente 20 à 25% d'identité avec les différents transporteurs d'urée eucaryotes décrits jusqu'à ce jour. Le rôle de Yut de *Y. pseudotuberculosis* dans la capture de l'urée a été déduit des trois observations suivantes : 1) l'inactivation de *yut* chez *Y. pseudotuberculosis* conduit à une activité uréolytique réduite lorsqu'elle est mesurée sur des cellules intactes mais normale lorsqu'elle est determinée sur un lysat cellulaire ; 2) la restauration de la capture de l'urée chez des mutants de *Y. pseudotuberculosis* et *H. pylori* défectueux pour le transport d'urée respectivement par les gènes hétérologues *ureI* et *yut* ; 3) l'augmentation de la perméabilité à l'urée de la membrane des oocytes de *Xenopus laevis* exprimant la protéine Yut.

L'analyse in silico des génomes a révélé la présence de gènes homologues à yut chez Y. pestis (> 99% d'identité), Y. enterocolitica (> 83% d'identité), A. pleuropneumoniae (28% d'identité), S. aureus (31% d'identité), P. aeruginosa (31% d'identité) et B. melitensis (46% d'identité). En utilisant des oligonucléotides dégénérés, nous avons pu également amplifier par PCR le gène yut chez les autres espèces uréolytiques du genre Yersinia (résultats non publiés). Tous les gènes homologues à yut codent des protéines partageant le motif peptidique LPXXTXPF qui est répété dans la région amino- et carboxy-terminale. Ce motif est considéré comme un trait caractéristique des transporteurs d'urée eucaryotes. La comparaison de la séquence du domaine LPXXTXPF des transporteurs d'urée procaryotes et eucaryotes a révélé que celui-ci est dégénéré chez les procaryotes. En conséquence, nous proposons un motif consensus répété plus général, commun à la fois aux transporteurs d'urée eucaryotes et procaryotes : TXPF. Compte-tenu de ces données et de l'absence d'identité entre les protéines Yut et UreI, nous avons conclu que les transporteurs de type Yut constituent une nouvelle famille de transporteurs d'urée bactériens.

Yut permet l'incorporation d'urée dans les oocytes et restaure le transport de l'urée chez un mutant *ureI* de *H. pylori*. Yut est donc nécessaire et suffisant au transport de l'urée à travers la membrane cellulaire. Contrairement au canal à urée UreI de *H. pylori*, Yut de *Y. pseudotuberculosis* n'est pas activé par l'acidité. Cette propriété peut raisonnablement être extrapolée aux transporteurs d'urée de *Y. pestis* et *Y. enterocolitica* en raison de leur identité élevée avec la protéine Yut de *Y. pseudotuberculosis*. Chez *Y. enterocolitica*, une activation de l'uréase cytoplasmique par l'acidité a été rapportée [357]. Toutefois, chez le mutant *yut* de *Y. pseudotuberculosis* complémenté par la protéine Yut de *Y. enterocolitica*, l'uréase cytoplasmique n'est pas activée à pH acide (publication n°3). Ainsi, il est possible qu'en fonction de l'acidité du milieu, un facteur encore non identifié mais spécifique de *Y. enterocolitica* régule l'activité du transporteur Yut ou l'activité de l'uréase indépendamment de Yut.

Nous avons observé que la mutation du gène *yut* de *Y. pseudotuberculosis* ne s'accompagne pas de la perte de la capacité de la bactérie à dégrader l'urée, ce qui suppose l'existence d'un autre transporteur d'urée chez cette espèce. Par une analyse *in silico* du génome de *Y. pseudotuberculosis*, nous avons repéré un opéron de 5 gènes codant des protéines similaires (28% à 42% d'identité) à celles formant le transporteur d'urée Fmd de *M. methylotrophus*. Toutefois, la délétion de cet opéron chez une souche sauvage ou un mutant *yut* de *Y. pseudotuberculosis* ne retentit pas sur l'activité uréolytique de la bactérie. Cependant, l'identification récente d'un transporteur d'urée de type ABC chez *Anabaena* 

166
PCC7120 ayant une identité encore plus élevée (>50%) avec le transporteur de type ABC de *Y. pseudotuberculosis* permet raisonnablement de penser que ce dernier a probablement un rôle dans l'incorporation cellulaire d'urée.

Responsable de l'incorporation d'urée dans le cytoplasme de Yersinia, Yut contrôle la disponibilité cellulaire du substrat de l'uréase. Le phénotype d'un mutant yut de Y. pseudotuberculosis se caractérise par une activité enzymatique plus basse et une résistance à l'acidité plus faible. Ce phénotype ressemble à celui d'un mutant ureB de Y. pseudotuberculosis [354]. Le mutant yut est aussi virulent que la souche sauvage ; néanmoins, il colonise moins rapidement l'intestin de la souris infestée par voie intra-gastrique. Ce retard peut être attribué à la réduction du nombre de bactéries lors du passage dans l'estomac. Il faut pondérer ce résultat en rappelant que les bactéries entéropathogènes entrent communément chez l'hôte avec le bol alimentaire et, dans ces conditions, le pH stomacal est proche de la neutralité. Le rôle de Yut dans la virulence ne paraît donc pas très pertinent lors d'une infection naturelle par Yersinia. Ce transporteur pourrait d'avantage intervenir dans la vie saprophyte de la bactérie, d'autant qu'il est présent chez les espèces de Yersinia dénuées de pouvoir pathogène. Néanmoins, nous n'excluons pas la possibilité que le transporteur Yut des Yersinia entéropathogènes ait pu évoluer vers une protéine mieux adaptée à la résistance contre l'acidité.

# IV. La régulation de l'uréase chez Y. pseudotuberculosis

Au cours de nos travaux, nous avons démontré que l'activité uréolytique de Y. *pseudotuberculosis* dépend de la phase de croissance, de la concentration en nickel et du transporteur Yut (publication n°3). Nous avons également montré que les souches de Y. *pseudotuberculosis* peuvent être réparties dans deux groupes en fonction de l'intensité de leur aptitude à dégrader l'urée (non publié). Le premier comporte les souches faiblement uréolytiques ; le deuxième, les souches fortement uréolytiques (non publié).

### IV.A. Le rôle de la région de 179 pb entre ureD et yut

La plus faible activité uréolytique de souches sauvages de Y. pseudotuberculosis dépourvues de 179 pb entre *ureD* et *yut* (Tableau 4) nous a suggéré que cette région de 179 pb pouvait participer à la régulation du locus *ure*. Nous avons donc émis l'hypothèse que la structure en épingle à cheveux putative formée grâce aux motifs répétés encadrant la séquence des 179 pb créerait un terminateur de transcription ; en son absence, un ARNm *ure* plus long, et surtout plus instable, serait alors produit. Cependant, après délétion des 179 pb dans une souche sauvage, l'activité uréolytique du mutant est inchangée (résultat non publié); cette donnée expérimentale va donc à l'encontre de notre hypothèse. L'autre possibilité serait éventuellement que la région de 179 pb, qui comprend dans sa partie centrale une séquence palindrome, régule l'expression de *yut*, les motifs de répétition constituant des sites de fixation potentiels de régulateurs transcriptionnels.

### IV.B. Le rôle de la phase de croissance

Lors de la mise au point du protocole de mesure de la résistance bactérienne à l'acidité, nous avons constaté que l'activité uréolytique de *Y. pseudotuberculosis* est élevée seulement durant la phase stationnaire de croissance, comme cela avait déjà été rapporté chez *Y. enterocolitica* [270]. L'augmentation de l'activité enzymatique résulte d'une meilleure transcription du locus uréase (résultats non publiés). La quantité d'ARNm spécifique de *yntABCDE* est aussi plus élevée lors de la phase stationnaire de croissance (résultats non publiés). En augmentant sa production d'uréase, la bactérie répondrait au besoin d'incorporer

des ions Ni<sup>2+</sup> dans l'apouréase en facilitant le transport des cations. Cette régulation simultanée des locus *ure* et *ynt* apparaît bien adaptée à la physiologie cellulaire. En effet, en augmentant l'entrée de nickel, la bactérie abolit la toxicité de ce cation en le séquestrant dans une métallo-enzyme.

Le mode de régulation par lequel la bactérie contrôle l'expression du locus *ure* et *ynt* en fonction de la phase de croissance semble dépendre de la tension en oxygène du milieu. En effet, la phase stationnaire est considérée comme une phase d'anaérobiose. La présence d'un site putatif de fixation du régulateur Fnr, qui est connu pour réguler un grand nombre de gènes soumis à des conditions anaérobies, dans la région promotrice du locus *ynt* permettait de penser que l'activité uréolytique de *Y. pseudotuberculosis* dépendait d'une régulation transcriptionnelle de l'opéron *ynt* par Fnr. Toutefois, nos données expérimentales (non publiées) montrent que l'activité uréolytique d'un mutant *fnr* en phase stationnaire de croissance reste identique à celle de la souche parentale. Une régulation par le facteur alternatif  $\sigma^{s}$  reste possible, bien que des expériences réalisées chez *Y. enterocolitica* aillent à l'encontre de cette hypothèse, où par le pH voire la densité cellulaire (*quorum sensing*).

### IV.C. Le rôle du nickel

Nous avons observé que l'activité uréolytique de Y. pseudotuberculosis augmente avec la quantité de nickel présente dans le milieu, le maximum étant atteint avec une concentration de  $1\mu$ M (publication n°2). Il est possible que comme pour H. pylori [277], cet accroissement soit la conséquence d'une activation de la transcription du locus uréase. Néanmoins, il n'est pas exclu que le locus uréase puisse être exprimé de manière constitutive et, dans ce cas, l'activité uréolytique de la bactérie dépendrait alors du nombre de molécules d'enzyme active au nombre de molécules d'apouréase. Ce rapport serait proportionnel à la quantité de nickel disponible dans le milieu.

## V. La variation de l'activité uréolytique chez Y. pestis

La perte de l'activité uréolytique par Y. pestis pourrait être liée à un mode de vie différent de celui de son ancêtre, Y. pseudotuberculosis. En effet, contrairement à cette dernière bactérie, Y. pestis n'est pas un saprophyte du sol, ni un parasite du tube digestif des animaux. Par conséquent, Y. pestis n'a pas la nécessité d'hydrolyser l'urée en ammoniaque pour se procurer l'azote utile à sa vie dans le milieu naturel ou pour résister à l'acidité digestive de ses hôtes. Néanmoins, il est possible qu'au travers d'un mécanisme de variation de phase dans ureD, la bactérie puisse moduler à son gré son activité uréolytique en fonction des circonstances rencontrées. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les conséquences de l'activité uréolytique sur le cycle biologique de Y. pestis. En présence d'urée dans le milieu ambiant, un mutant uréolytique aurait un avantage sélectif (possibilité d'utiliser une source d'azote très facilement assimilable) sur la souche sauvage pour coloniser un écosystème (sol ou animaux). Cette hypothèse paraît improbable puisque la plupart des isolats de Y. pestis ne sont pas uréolytiques. Ainsi, il semble que l'uréolyse soit plutôt néfaste à la vie de la bactérie et que la réversion du phénotype (non uréolytique vers uréolytique) soit une impasse évolutive. Donc, le mutant uréolytique est soit rapidement contre-sélectionné lors du cycle de vie de l'agent infectieux soit, revient à l'état sauvage à une fréquence plus élevée  $(>10^{-4})$  que celle à laquelle il est apparu  $(10^{-4} à 10^{-5})$ . La possibilité d'une réversion du phénotype uréolytique est renforcée par les observations anciennes de Levina qui avait constaté que les souches isolées au début d'une épizootie de peste étaient incapables de dégrader l'urée contrairement à celles isolées à la fin de l'épidémie.

Les observations de Levina, la fréquence élevée d'apparition de mutants uréolytiques *in vitro*, la conservation de la fonctionnalité des protéines Yut, UreH et Ynt chez *Y. pestis* sont autant de faits favorisant l'hypothèse que l'uréolyse pourrait avoir un rôle à certains moments

dans la vie de la bactérie. Nos travaux ont démontré que la présence d'une activité uréolytique chez *Y. pestis* ne modifie pas sa virulence, quelle que soit la voie d'entrée de la bactérie chez l'hôte (sous-cutanée ou orale).

A partir de nos données expérimentales et de la littérature, on peut imaginer que selon l'habitat rencontré, *Y. pestis* soit uréolytique ou non. D'après les travaux épidémiologiques pionniers de Balthazar et Mollaret, *Y. pestis* est capable de survivre dans des cadavres de rongeurs fouisseurs et, par conséquent, dans le sol, après décomposition complète de ces animaux, pendant au moins deux ans. Dans ces conditions, *Y. pestis* subirait des modifications génétiques qui lui permettraient de recouvrer des capacités métaboliques, dont la dégradation de l'urée, nécessaire à sa vie saprophytique. Les bactéries résurgentes du sol seraient donc uréolytiques et elles redeviendraient incapables de dégrader l'urée (phénotype sauvage) lors du passage chez l'animal. Néanmoins, Lévina ainsi que nous même n'avons pas observé une telle réversion après passage chez les rongeurs. Il est toutefois possible que cette sélection survienne chez la puce. Des données préliminaires obtenues après infestation de puces par un triple mutant Ure<sup>+</sup>Inv<sup>+</sup>YadA<sup>+</sup> semblent favoriser cette idée, le blocage du proventricule étant apparemment défectueux avec une telle souche.

En conclusion, l'un des objectifs de notre thèse de doctorat était d'identifier les gènes impliqués dans l'activité uréolytique de *Y. pseudotuberculosis*. Nous avons caractérisé une nouvelle famille de transporteur d'urée procaryote, Yut. De plus, deux transporteurs de nickel, UreH et YntABCDCE ont été également identifiés à proximité du locus uréase. En comparant, l'ensemble des séquences des transporteurs de nickel de type ABC connus, nous avons constaté que le transporteur Ynt était le chef de file d'une nouvelle sous famille. En revanche, le second transporteur de nickel (UreH) appartient à la famille des transporteurs de nickel à composant unique HoxN. La spécificité de ces différents transporteurs vis-à-vis de

leurs substrats ainsi que leurs caractéristiques biochimiques n'ont pas été étudiées. Dans l'attente de la détermination de la structure tridimensionnelle de ces transporteurs ; seuls ou complexés avec leurs ligands, des expériences de mutagenèse dirigée d'acides aminés conservés et de fusion de segments de ces transporteurs avec des gènes rapporteurs devraient permettre de préciser les domaines protéiques et les résidus nécessaires à la reconnaissance et au transport du substrat. La comparaison des structures tridimensionnelles des transporteurs d'urée eucaryotes et procaryotes permettrait de mieux comprendre comment la structure du transporteur a été modelée au cours de l'évolution pour s'adapter à la physiologie cellulaire. Un autre axe de recherche pourrait viser à élucider l'expression des gènes *ure*, *ynt* et *yut* ainsi que le mode d'action de leurs produits dans la machinerie cellulaire. En particulier, la régulation de l'activité uréolytique en fonction de la phase de croissance bactérienne et de la concentration en nickel présente dans l'environnement bactérien reste à définir. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu assigner à UreH un quelconque rôle dans l'activation de l'uréase ; il serait donc intéressant de rechercher l'environnement le mieux adapté à une fonction optimale de ce transporteur.

Le deuxième objectif de notre travail était de déterminer les mécanismes moléculaires concourant à l'absence d'une activité uréolytique de Y. pestis en dépit de l'existence d'un locus uréase et, d'apprécier le retentissement de cette incapacité métabolique sur la virulence bactérienne. La comparaison de la séquence nucléotidique du locus uréase de Y. pestis et Y. pseudotuberculosis a révélé que l'insertion d'une guanine dans le gène ureD était la seule cause de l'absence de l'activité uréolytique. Nous avons pu sélectionner des mutants qui ayant perdu cette guanine supplémentaire, recouvraient le phénotype de Y. pseudotuberculosis. En revanche, la sélection de la mutation réverse a échoué. Néanmoins, nos données moléculaires ainsi que les données de la littérature suggèrent que l'uréase de Y. pestis oscille entre une

forme active et une forme inactive, par variation de phase dans *ureD*. La variation d'activité enzymatique permettrait à la bactérie de survivre dans le sol (phénotype uréolytique) et d'être transmise dans les populations de rongeurs par les puces (phénotype non uréolytique). La caractérisation phénotypique des souches de *Y. pestis* infectant les animaux ou isolées du sol tout au long d'une épizootie, permettrait de confirmer ou d'infirmer la variation génétique du locus uréase ainsi que son potentiel rôle réél au cours du cycle biologique de la bactérie. Des études de survie de *Y. pestis*, uréolytique ou non, dans un milieu artificiel simulant le sol permettraient de démontrer le rôle de l'uréase dans la vie saprophytique temporaire de *Y. pestis*. 1. Smego, R.A., J. Frean, and H.J. Koornhof, Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. 18(1): p. 1-15.

2. Perry, R.D. and J.D. Fetherston, *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev, 1997. 10(1): p. 35-66.

3. Ibrahim, A., et al., The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. FEMS Microbiol Lett, 1993. 114(2): p. 173-7.

4. Sebbane, F., et al., Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene. Infect Immun, 2001. 69(1): p. 170-6.

5. Achtman, M., et al., *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(24): p. 14043-8.

6. Simonet, M., et al., Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. Infect Immun, 1996. 64(1): p. 375-9.

7. Fantasia, M., et al., Characterisation of *Yersinia* species isolated from a kennel and from cattle and pig farms. Vet Rec, 1993. 132(21): p. 532-4.

8. Massa, S., et al., Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from river water. Zentralbl Mikrobiol, 1988. 143(8): p. 575-81.

9. Bercovier, H. and H.H. Mollaret, The Family Enterobacteriaceae, genus *Yersinia*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984: p. 498-506.

10. Brubaker, R.R., The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. Curr Top Microbiol Immunol, 1972. 57: p. 111-58.

11. Hinnebusch, B.J., Bubonic plague: a molecular genetic case history of the emergence of an infectious disease. J Mol Med, 1997. 75(9): p. 645-52.

12. Hinnebusch, B.J., R.D. Perry, and T.G. Schwan, Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. Science, 1996. 273(5273): p. 367-70.

13. Butler, T., *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. Clin Infect Dis, 1994. 19(4): p. 655-61; quiz 662-3.

Cover, T.L. and R.C. Aber, *Yersinia enterocolitica*. N Engl J Med, 1989. 321(1): p. 16-24.

15. Bottone, E.J., Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clin Microbiol Rev, 1997. 10(2): p. 257-76.

16. Van Noyen, R., et al., Causative role of *Yersinia* and other enteric pathogens in the appendicular syndrome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1991. 10(9): p. 735-41.

17. Rao, P.M., et al., Effect of computed tomography of the appendix on treatment of patients and use of hospital resources. N Engl J Med, 1998. 338(3): p. 141-6.

18. Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens, HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection. J Rheumatol, 1980. 7(5): p. 706-10.

19. Probst, P., E. Hermann, and B. Fleischer, Role of bacteria-specific T cells in the immunopathogenesis of reactive arthritis. Trends Microbiol, 1994. 2(9): p. 329-32.

20. Gaston, J.S., et al., Synovial T lymphocyte recognition of organisms that trigger reactive arthritis. Clin Exp Immunol, 1989. 76(3): p. 348-53.

21. Granfors, K., et al., *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. N Engl J Med, 1989. 320(4): p. 216-21.

22. Luo, G., et al., Purification and characterization of *Yersinia enterocolitica* envelope proteins which induce antibodies that react with human thyrotropin receptor. J Immunol, 1994. 152(5): p. 2555-61.

23. Szymanski, C.M., et al., *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. Infect Immun, 1995. 63(11): p. 4295-300.

24. Ottemann, K.M. and J.F. Miller, Roles for motility in bacterial-host interactions. Mol Microbiol, 1997. 24(6): p. 1109-17.

25. Fauconnier, A., et al., Flagellar *flhA*, *flhB* and *flhE* genes, organized in an operon, cluster upstream from the inv locus in *Yersinia enterocolitica*. Microbiology, 1997. 143(Pt 11): p. 3461-71.

26. Parkhill, J., et al., Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature, 2001. 413(6855): p. 523-7.

27. Iriarte, M., et al., The *fliA* gene encoding sigma 28 in Yersinia enterocolitica. J Bacteriol, 1995. 177(9): p. 2299-304.

28. Fernandez, L.A. and J. Berenguer, Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev, 2000. 24(1): p. 21-44.

29. Kapatral, V., et al., Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* Class III flagellar genes. Mol Microbiol, 1996. 19(5): p. 1061-71.

30. Young, G.M., J.L. Badger, and V.L. Miller, Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 2000. 68(7): p. 4323-6.

31. Aleksic, S., et al., Immune response to flagellar antigens in human infections with *Yersinia enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol, 1991. 12: p. 110-6.

32. Schmitt, C.K., et al., Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. Infect Immun, 2001. 69(9): p. 5619-25.

33. Watnick, P.I., et al., The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol Microbiol, 2001. 39(2): p. 223-35.

34. Schmiel, D.H., G.M. Young, and V.L. Miller, The Yersinia enterocolitica phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. J Bacteriol, 2000. 182(8): p. 2314-20.
35. Iriarte, M., et al., The Myf fibrillae of Yersinia enterocolitica. Mol Microbiol, 1993.
9(3): p. 507-20.

36. Lindler, L.E. and B.D. Tall, *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. Mol Microbiol, 1993. 8(2): p. 311-24.

37. Lindler, L.E., M.S. Klempner, and S.C. Straley, *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. Infect Immun, 1990. 58(8): p. 2569-77.

38. Price, S.B., M.D. Freeman, and K.S. Yeh, Transcriptional analysis of the *Yersinia pestis* pH 6 antigen gene. J Bacteriol, 1995. 177(20): p. 5997-6000.

39. Yang, Y., et al., The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. Infect Immun, 1996. 64(7): p. 2483-9.

40. Yang, Y. and R.R. Isberg, Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components. Mol Microbiol, 1997. 24(3): p. 499-510.

41. Iriarte, M. and G.R. Cornelis, MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol, 1995. 177(3): p. 738-44.

42. Paerregaard, A., et al., Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. Infect Immun, 1991. 59(1): p. 253-60.

43. Bolin, I. and H. Wolf-Watz, Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun, 1984. 43(1): p. 72-8.

44. Bolin, I., L. Norlander, and H. Wolf-Watz, Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. Infect Immun, 1982. 37(2): p. 506-12.

45. Skurnik, M. and H. Wolf-Watz, Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. Mol Microbiol, 1989. 3(4): p. 517-29.

46. Rosqvist, R., M. Skurnik, and H. Wolf-Watz, Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. Nature, 1988. 334(6182): p. 522-4.

47. Gripenberg-Lerche, C., M. Skurnik, and P. Toivanen, Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. Infect Immun, 1995. 63(8): p. 3222-6.

48. Mack, D., J. Heesemann, and R. Laufs, Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. Med Microbiol Immunol (Berl), 1994. 183(4): p. 217-27.

49. Skurnik, M., et al., Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. J Bacteriol, 1984. 158(3): p. 1033-6.

50. Hoiczyk, E., et al., Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. Embo J, 2000. 19(22): p. 5989-99.

51. El Tahir, Y. and M. Skurnik, YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. Int J Med Microbiol, 2001. 291(3): p. 209-18.

52. Yang, Y. and R.R. Isberg, Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis yadA* product. Infect Immun, 1993. 61(9): p. 3907-13.

53. Bliska, J.B., M.C. Copass, and S. Falkow, The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. Infect Immun, 1993. 61(9): p. 3914-21.

54. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. 11(1): p. 142-201.

55. Yamamoto, T. and I. Taneike, The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. FEBS Lett, 2000. 472(1): p. 22-6.

56. Yoshino, K., et al., Characterization of a highly toxic, large molecular size heat-stable enterotoxin produced by a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica*. FEBS Lett, 1995. 362(3): p. 319-22.

57. Delor, I. and G.R. Cornelis, Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. Infect Immun, 1992. 60(10): p. 4269-77.

58. Delor, I., et al., Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. Infect Immun, 1990. 58(9): p. 2983-8.

59. Robins-Browne, R.M., et al., Assessment of enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica* and identification of a novel heat-stable enterotoxin produced by a noninvasive *Y. enterocolitica* strain isolated from clinical material. Infect Immun, 1993. 61(2): p. 764-7.

60. Ramamurthy, T., et al., The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. Microb Pathog, 1997. 23(4): p. 189-200.

61. Sulakvelidze, A., et al., Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a recently identified *Yersinia enterocolitica*-like species. Infect Immun, 1999. 67(2): p. 968-71.

62. Huang, X., et al., Nucleotide sequence of a gene encoding the novel *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin that includes a pro-region-like sequence in its mature toxin molecule. Microb Pathog, 1997. 22(2): p. 89-97.

63. Mikulskis, A.V., et al., Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. Mol Microbiol, 1994. 14(5): p. 905-15.

64. Iriarte, M., I. Stainier, and G.R. Cornelis, The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. Infect Immun, 1995. 63(5): p. 1840-7.

65. Miller, V.L. and S. Falkow, Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect Immun, 1988. 56(5): p. 1242-8.

66. Isberg, R.R., D.L. Voorhis, and S. Falkow, Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. Cell, 1987. 50(5): p. 769-78.

67. Cowan, C., et al., Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. Infect Immun, 2000. 68(8): p. 4523-30.

68. Miller, V.L., et al., The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. Infect Immun, 1989. 57(1): p. 121-31.

69. Pierson, D.E. and S. Falkow, Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional inv-homologous sequences. Infect Immun, 1990. 58(4): p. 1059-64.

70. Isberg, R.R. and J.M. Leong, Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. Cell, 1990. 60(5): p. 861-71.

71. Simonet, M. and S. Falkow, Invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun, 1992. 60(10): p. 4414-7.

72. Saltman, L.H., et al., A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23438-44.

73. Clark, M.A., B.H. Hirst, and M.A. Jepson, M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. Infect Immun, 1998. 66(3): p. 1237-43.

74. McCormick, B.A., et al., Unmasking of intestinal epithelial lateral membrane betal integrin consequent to transepithelial neutrophil migration in vitro facilitates inv-mediated invasion by *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun, 1997. 65(4): p. 1414-21.

75. Schulte, R., et al., Translocation of *Yersinia entrocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. Cell Microbiol, 2000. 2(2): p. 173-85.

76. Dersch, P. and R.R. Isberg, A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self- association. Embo J, 1999. 18(5): p. 1199-213.

77. Dersch, P. and R.R. Isberg, An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. Infect Immun, 2000. 68(5): p. 2930-8.

78. Pepe, J.C., et al., Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect Immun, 1995. 63(12): p. 4837-48.

79. Pepe, J.C., J.L. Badger, and V.L. Miller, Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica inv* gene. Mol Microbiol, 1994. 11(1): p. 123-35.

80. Pepe, J.C. and V.L. Miller, *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(14): p. 6473-7.

81. Roggenkamp, A., et al., Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Mol Microbiol, 1995. 16(6): p. 1207-19.

82. Miller, V.L., J.B. Bliska, and S. Falkow, Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product. J Bacteriol, 1990. 172(2): p. 1062-9.

83. Miller, V.L., et al., Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. Mol Microbiol, 2001. 41(5): p. 1053-62.

84. Wachtel, M.R. and V.L. Miller, In vitro and in vivo characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 1995. 63(7): p. 2541-8.

85. Bliska, J.B. and S. Falkow, Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(8): p. 3561-5.

86. Pederson, K.J. and D.E. Pierson, Ail expression in *Yersinia enterocolitica* is affected by oxygen tension. Infect Immun, 1995. 63(10): p. 4199-201.

87. Tamm, A., et al., Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 1993. 10(5): p. 995-1011.

88. Marra, A. and R.R. Isberg, Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. Infect Immun, 1997. 65(8): p. 3412-21.

89. Butler, T., et al., Experimental *Yersinia pestis* infection in rodents after intragastric inoculation and ingestion of bacteria. Infect Immun, 1982. 36(3): p. 1160-7.

90. Lahteenmaki, K., M. Kukkonen, and T.K. Korhonen, The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. FEBS Lett, 2001. 504(1-2): p. 69-72.

91. Lahteenmaki, K., et al., Expression of plasminogen activator pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. Infect Immun, 1998. 66(12): p. 5755-62.

92. Sodeinde, O.A., et al., Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. Infect Immun, 1988. 56(10): p. 2749-52.

93. Cornelis, G.R., et al., The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(4): p. 1315-52.

94. Cornelis, G.R., The Yersinia deadly kiss. J Bacteriol, 1998. 180(21): p. 5495-504.

95. Cornelis, G.R., Molecular and cell biology aspects of plague. Proc Natl Acad Sci U S A,2000. 97(16): p. 8778-83.

96. Cornelis, G.R., et al., The Yersinia yop regulon. Mol Microbiol, 1989. 3(10): p. 1455-9.

97. Michiels, T., et al., Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. Infect Immun, 1990. 58(9):p. 2840-9.

98. Fields, K.A., et al., Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. Infect Immun, 1999. 67(10): p. 5395-408.

99. Blocker, A., D. Holden, and G. Cornelis, Type III secretion systems : what is the translocator and what is translocated ? Cell. Microb., 2000. 2(5): p. 387-390.

100. Perry, R.D., et al., DNA sequencing and analysis of the low-Ca2+-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. Infect Immun, 1998. 66(10): p. 4611-23.

101. Portnoy, D.A., et al., Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. Infect Immun, 1984. 43(1): p. 108-14.

102. Bolin, I., et al., Identification and mapping of the temperature-inducible, plasmidencoded proteins of *Yersinia* spp. Infect Immun, 1988. 56(2): p. 343-8.

103. Bliska, J.B., Yop effectors of *Yersinia* spp. and actin rearrangements. Trends Microbiol,2000. 8(5): p. 205-8.

104. Cornelis, G.R. and F. Van Gijsegem, Assembly and function of type III secretory systems. Annu Rev Microbiol, 2000. 54: p. 735-74.

105. Hueck, C.J., Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(2): p. 379-433.

106. Iriarte, M. and G.R. Cornelis, Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia yop* virulon. J Bacteriol, 1999. 181(2): p. 675-80.

107. Koster, M., et al., The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. Mol Microbiol, 1997. 26(4): p. 789-97.

108. Woestyn, S., et al., YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. J Bacteriol, 1994. 176(6): p. 1561-9.

109. Stainier, I., et al., YscP, a *Yersinia* protein required for Yop secretion that is surface exposed, and released in low Ca2+. Mol Microbiol, 2000. 37(5): p. 1005-18.

110. Payne, P.L. and S.C. Straley, YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. J Bacteriol, 1999. 181(9): p. 2852-62.

111. Payne, P.L. and S.C. Straley, YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. J Bacteriol, 1998. 180(15): p. 3882-90.

112. Day, J.B. and G.V. Plano, The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. J Bacteriol, 2000. 182(7): p. 1834-43.

113. Jackson, M.W. and G.V. Plano, Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. FEMS Microbiol Lett, 2000. 186(1): p. 85-90.

114. Day, J.B., I. Guller, and G.V. Plano, Yersinia pestis YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds yscE. Infect Immun, 2000. 68(11): p. 6466-71.

115. Forsberg, A., et al., The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol, 1991. 5(4): p. 977-86.

116. Iriarte, M., et al., TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of Yersinia Yop effectors. Embo J, 1998. 17(7): p. 1907-18.

117. Neyt, C. and G.R. Cornelis, Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. Mol Microbiol, 1999. 33(5): p. 971-81.

118. Neyt, C. and G.R. Cornelis, Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. Mol Microbiol, 1999. 31(1): p. 143-56.

119. Sarker, M.R., et al., The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. J Bacteriol, 1998. 180(5): p. 1207-14.

120. Hoiczyk, E. and G. Blobel, Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia* enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(8):
p. 4669-74.

121. Hakansson, S., et al., The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. Embo J, 1996. 15(21): p. 5812-23.

122. Cheng, L.W., D.M. Anderson, and O. Schneewind, Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 1997. 24(4): p. 757-65.

123. Boyd, A.P., I. Lambermont, and G.R. Cornelis, Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. J Bacteriol, 2000. 182(17): p. 4811-21.

124. Von Pawel-Rammingen, U., et al., GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. Mol Microbiol, 2000. 36(3): p. 737-48.

125. Black, D.S. and J.B. Bliska, The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. Mol Microbiol, 2000. 37(3): p. 515-27.

126. Green, S.P., et al., Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with *Yersinia enterocolitica*. J Leukoc Biol, 1995. 57(6): p. 972-7.

127. Sorg, I., et al., Recombinant Yersinia YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. Infect Immun, 2001. 69(12): p. 7535-43.

128. Galyov, E.E., S. Hakansson, and H. Wolf-Watz, Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. J Bacteriol, 1994. 176(15): p. 4543-8.

129. Orth, K., et al., Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. Science, 1999. 285(5435): p. 1920-3.

130. Lambert de Rouvroit, C., C. Sluiters, and G.R. Cornelis, Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 1992. 6(3): p. 395-409.

131. Hoe, N.P. and J.D. Goguen, Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. J Bacteriol, 1993. 175(24): p. 7901-9.

132. Rohde, J.R., et al., The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. J Bacteriol, 1999. 181(14): p. 4198-204.

133. Cambronne, E.D., L.W. Cheng, and O. Schneewind, LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia* yop virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. Mol Microbiol, 2000. 37(2): p. 263-73.

134. Pettersson, J., et al., Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. Science, 1996. 273(5279): p. 1231-3.

135. Anderson, D.M. and O. Schneewind, *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. Mol Microbiol, 1999. 31(4): p. 1139-48.

136. Anderson, D.M. and O. Schneewind, A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science, 1997. 278(5340): p. 1140-3.

137. Sory, M.P., et al., Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(26): p. 11998-2002.

138. Day, J.B. and G.V. Plano, A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. Mol Microbiol, 1998. 30(4): p. 777-88.

139. Iriarte, M. and G.R. Cornelis, YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. Mol Microbiol, 1998. 29(3): p. 915-29.

140. Woestyn, S., et al., The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. Mol Microbiol, 1996. 20(6): p. 1261-71.

141. Cheng, L.W. and O. Schneewind, Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. Trends Microbiol, 2000. 8(5): p. 214-20

142. Nilles, M.L., et al., *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca2+ response. J Bacteriol, 1997. 179(4): p. 1307-16.

143. Stainier, I., M. Iriarte, and G.R. Cornelis, YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of *yop* transcription. Mol Microbiol, 1997. 26(4): p. 833-43.

144. Williams, A.W. and S.C. Straley, YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low- calcium response in addition to its role in translocation of Yops. J Bacteriol, 1998. 180(2): p. 350-8.

145. Wattiau, P., et al., Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(22): p. 10493-7.

146. Palmer, L.E., et al., YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. Mol Microbiol, 1998. 27(5): p. 953-65.

147. Palmer, L.E., et al., YopJ of *Yersinia* spp. is sufficient to cause downregulation of multiple mitogen-activated protein kinases in eukaryotic cells. Infect Immun, 1999. 67(2): p. 708-16.

148. Nakajima, R., V.L. Motin, and R.R. Brubaker, Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. Infect Immun, 1995. 63(8): p. 3021-9.

149. Welkos, S., et al., V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. Microb Pathog, 1998. 24(3): p. 185-96.

150. Pilz, D., et al., Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia* enterocolitica serotype O3. Infect Immun, 1992. 60(1): p. 189-95.

151. China, B., et al., Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun, 1994. 62(4): p. 1275-81.

152. China, B., et al., Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia* enterocolitica by C3b molecules. Infect Immun, 1993. 61(8): p. 3129-36.

153. Perry, R.D. and R.R. Brubaker, Vwa+ phenotype of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 1983. 40(1): p. 166-71.

154. Balligand, G., Y. Laroche, and G. Cornelis, Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect Immun, 1985. 48(3): p. 782-6.

155. Bliska, J.B., et al., The *Yersinia* tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. J Exp Med, 1992. 176(6): p. 1625-30.

156. Galyov, E.E., et al., Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes. FEBS Lett, 1990. 277(1-2): p. 230-2.

157. MacIntyre, S., et al., An extended hydrophobic interactive surface of *Yersinia pestis* Caf1M chaperone is essential for subunit binding and F1 capsule assembly. Mol Microbiol, 2001. 39(1): p. 12-25.

158. Galyov, E.E., et al., Expression of the envelope antigen F1 of *Yersinia pestis* is mediated by the product of *caf1M* gene having homology with the chaperone protein PapD of Escherichia coli. FEBS Lett, 1991. 286(1-2): p. 79-82.

159. Karlyshev, A.V., et al., A new gene of the fl operon of *Y. pestis* involved in the capsule biogenesis. FEBS Lett, 1992. 297(1-2): p. 77-80.

160. Chapman, D.A., et al., Structural and functional significance of the FGL sequence of the periplasmic chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*. J Bacteriol, 1999. 181(8): p. 2422-9.

161. Drozdov, I.G., et al., Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis. J Med Microbiol, 1995. 42(4): p. 264-8.

162. Sodeinde, O.A., et al., A surface protease and the invasive character of plague. Science,1992. 258(5084): p. 1004-7.

163. Kukkonen, M., et al., Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. Mol Microbiol, 2001. 40(5): p. 1097-111.

164. Schmiel, D.H., et al., Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. Infect Immun, 1998. 66(8): p. 3941-51.

165. Young, G.M., D.H. Schmiel, and V.L. Miller, A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(11): p. 6456-61.

166. Tsubokura, M., et al., Production of indirect hemolysin by *Yersinia enterocolitica* and its properties. Infect Immun, 1979. 25(3): p. 939-42.

167. Geoffroy, V.A., J.D. Fetherston, and R.D. Perry, *Yersinia pestis* YbtU and YbtT are involved in synthesis of the siderophore yersiniabactin but have different effects on regulation. Infect Immun, 2000. 68(8): p. 4452-61.

168. Jacobi, C.A., et al., Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. Infect Immun, 2001. 69(12): p. 7772-82.

169. Rakin, A., et al., Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 1999. 67(10): p. 5265-74.

170. Carniel, E., I. Guilvout, and M. Prentice, Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol, 1996. 178(23): p. 6743-51.

171. Buchrieser, C., et al., The 102-kilobase pgm locus of Yersinia pestis: sequence analysis and comparison of selected regions among different Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis strains. Infect Immun, 1999. 67(9): p. 4851-61.

172. Pelludat, C., et al., The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia* enterocolitica: organization and siderophore-dependent regulation. J Bacteriol, 1998. 180(3):
p. 538-46.

173. Fetherston, J.D., V.J. Bertolino, and R.D. Perry, YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. Mol Microbiol, 1999. 32(2): p. 289-99.

174. Fetherston, J.D., J.W. Lillard, Jr., and R.D. Perry, Analysis of the pesticin receptor from *Yersinia pestis*: role in iron- deficient growth and possible regulation by its siderophore. J Bacteriol, 1995. 177(7): p. 1824-33.

175. Perry, R.D., et al., Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. Microbiology, 1999. 145(Pt 5): p. 1181-90.

176. Carniel, E., et al., Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. Mol Microbiol, 1992. 6(3): p. 379-88.

177. Guilvout, I., E. Carniel, and A.P. Pugsley, *Yersinia* spp. HMWP2, a cytosolic protein with a cryptic internal signal sequence which can promote alkaline phosphatase export. J Bacteriol, 1995. 177(7): p. 1780-7.

178. Staggs, T.M. and R.D. Perry, Identification and cloning of a *fur* regulatory gene in *Yersinia pestis*. J Bacteriol, 1991. 173(2): p. 417-25.

179. Staggs, T.M. and R.D. Perry, Fur regulation in *Yersinia* species. Mol Microbiol, 1992.6(17): p. 2507-16.

180. Staggs, T.M., J.D. Fetherston, and R.D. Perry, Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis fur* mutation. J Bacteriol, 1994. 176(24): p. 7614-24.

181. Bearden, S.W., J.D. Fetherston, and R.D. Perry, Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. Infect Immun, 1997. 65(5): p. 1659-68.

182. Gehring, A.M., et al., Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. Chem Biol, 1998. 5(10): p. 573-86.

183. Gehring, A.M., et al., The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*.
Biochemistry, 1998. 37(48): p. 17104.

184. Fetherston, J.D. and R.D. Perry, The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. Mol Microbiol, 1994. 13(4): p. 697-708.

185. Bearden, S.W., T.M. Staggs, and R.D. Perry, An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. J Bacteriol, 1998. 180(5): p. 1135-47.

186. Bearden, S.W. and R.D. Perry, The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. Mol Microbiol, 1999. 32(2): p. 403-14.

187. Lillard, J.W., Jr., et al., Sequence and genetic analysis of the hemin storage (*hms*) system of *Yersinia pestis*. Gene, 1997. 193(1): p. 13-21.

188. Pendrak, M.L. and R.D. Perry, Characterization of a hemin-storage locus of *Yersinia pestis*. Biol Met, 1991. 4(1): p. 41-7.

189. Pendrak, M.L. and R.D. Perry, Proteins essential for expression of the Hms+ phenotype of *Yersinia pestis*. Mol Microbiol, 1993. 8(5): p. 857-64.

190. Lillard, J.W., Jr., et al., The haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is not essential for the pathogenesis of bubonic plague in mammals. Microbiology, 1999. 145(Pt 1): p. 197-209.

191. Skurnik, M., et al., The putative arthritogenic cationic 19-kilodalton antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease beta-subunit. Infect Immun, 1993. 61(6): p. 2498-504.

192. Probst, P., et al., Identification of the *Yersinia enterocolitica* urease beta subunit as a target antigen for human synovial T lymphocytes in reactive arthritis. Infect Immun, 1993. 61(10): p. 4507-9.

193. Mertz, A.K., et al., Cationic *Yersinia* antigen-induced chronic allergic arthritis in rats. A model for reactive arthritis in humans. J Clin Invest, 1991. 88(2): p. 632-42.

194. Probst, P., et al., Multiclonal synovial T cell response to *Yersinia enterocolitica* in reactive arthritis: the *Yersinia* 61-kDa heat-shock protein is not the major target antigen. J Infect Dis, 1993. 167(2): p. 385-91.

195. Gripenberg-Lerche, C., et al., Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and o:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. Infect Immun, 2000. 68(2): p. 942-7.

196. Schulze-Koops, H., et al., Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. Infect Immun, 1993. 61(6): p. 2513-9.

197. Tertti, R., et al., Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. Infect Immun, 1992. 60(7): p. 3021-4.

198. Tahir, Y.E., P. Kuusela, and M. Skurnik, Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification Of eight NSVAIG - S motifs in the aminoterminal half of the protein involved in collagen binding. Mol Microbiol, 2000. 37(1): p. 192-206. 199. Gripenberg-Lerche, C., et al., Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia* enterocolitica serotype O:8: experimental studies with rats. Infect Immun, 1994. 62(12): p. 5568-75.

200. Miyoshi-Akiyama, T., K. Imanishi, and T. Uchiyama, Purification and partial characterization of a product from *Yersinia pseudotuberculosis* with the ability to activate human T cells. Infect Immun, 1993. 61(9): p. 3922-7.

201. Ito, Y., et al., Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein. J Immunol, 1995. 154(11): p. 5896-906.

202. Ramamurthy, T., et al., Purification, characterization and cloning of a novel variant of the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen. FEBS Lett, 1997. 413(1): p. 174-6.

203. Ito, Y., et al., Analysis of functional regions of YPM, a superantigen derived from gram-negative bacteria. Eur J Biochem, 1999. 263(2): p. 326-37.

204. Abe, J., et al., Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. J Clin Invest, 1997. 99(8): p. 1823-30.

205. Uchiyama, T., et al., Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic symptoms. J Immunol, 1993. 151(8): p. 4407-13.

206. Carnoy, C. and M. Simonet, *Yersinia pseudotuberculosis* superantigenic toxins. The comprehensive Sourcebook of Bacterial Toxins, 2000: p. 611-622.

207. Stuart, P.M. and J.G. Woodward, *Yersinia enterocolitica* produces superantigenic activity. J Immunol, 1992. 148(1): p. 225-33.

208. Miyoshi-Akiyama, T., et al., Identification of murine T cells reactive with the bacterial superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM) and factors involved in YPM-induced toxicity in mice. Microbiol Immunol, 1997. 41(4): p. 345-52.

209. Jabri, E., et al., The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. Science, 1995. 268(5213): p. 998-1004.

210. Mobley, H.L. and R.P. Hausinger, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. Microbiol Rev, 1989. 53(1): p. 85-108.

211. Ferrero, R.L. and A. Labigne, Cloning, expression and sequencing of *Helicobacter felis* urease genes. Mol Microbiol, 1993. 9(2): p. 323-33.

212. Ha, N.C., et al., Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. Nat Struct Biol, 2001. 8(6): p. 505-9.

213. Benini, S., et al., A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. Structure Fold Des, 1999. 7(2): p. 205-16.

214. Palinska, K.A., et al., *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. Microbiology, 2000. 146 Pt 12: p. 3099-107.
215. Todd, M.J. and R.P. Hausinger, Competitive inhibitors of *Klebsiella aerogenes* urease. Mechanisms of interaction with the nickel active site. J Biol Chem, 1989. 264(27): p. 15835-42.

216. Park, I.S. and R.P. Hausinger, Requirement of carbon dioxide for in vitro assembly of the urease nickel metallocenter. Science, 1995. 267(5201): p. 1156-8.

217. Pearson, M.A., et al., Chemical rescue of *Klebsiella aerogenes* urease variants lacking the carbamylated-lysine nickel ligand. Biochemistry, 1998. 37(17): p. 6214-20.

218. Pearson, M.A., et al., Kinetic and structural characterization of urease active site variants. Biochemistry, 2000. 39(29): p. 8575-84.

219. Jones, B.D. and H.L. Mobley, *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. J Bacteriol, 1988. 170(8): p. 3342-9.

220. Phadnis, S.H., et al., Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. Infect Immun, 1996. 64(3): p. 905-12.

221. Vanet, A. and A. Labigne, Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. Infect Immun, 1998. 66(3): p. 1023-7.

222. Marcus, E.A. and D.R. Scott, Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 2001. 6(2): p. 93-9.

223. Park, I.S., M.B. Carr, and R.P. Hausinger, In vitro activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(8): p. 3233-7.

224. Moncrief, M.B. and R.P. Hausinger, Purification and activation properties of UreD-UreF-urease apoprotein complexes. J Bacteriol, 1996. 178(18): p. 5417-21.

225. Moncrief, M.B. and R.P. Hausinger, Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease. J Bacteriol, 1997. 179(13): p. 4081-6.

226. Soriano, A., G.J. Colpas, and R.P. Hausinger, UreE stimulation of GTP-dependent urease activation in the UreD-UreF- UreG-urease apoprotein complex. Biochemistry, 2000. 39(40): p. 12435-40.

227. Soriano, A. and R.P. Hausinger, GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(20): p. 11140-4.

228. Park, I.S. and R.P. Hausinger, Evidence for the presence of urease apoprotein complexes containing UreD, UreF, and UreG in cells that are competent for in vivo enzyme activation. J Bacteriol, 1995. 177(8): p. 1947-51.

229. Colpas, G.J. and R.P. Hausinger, In vivo and in vitro kinetics of metal transfer by the *Klebsiella aerogenes* urease nickel metallochaperone, UreE. J Biol Chem, 2000. 275(15): p. 10731-7.

230. Song, H.K., et al., Crystal structure of *Klebsiella aerogenes* UreE, a nickel-binding metallochaperone for urease activation. J Biol Chem, 2001. 8: p. 8.

231. Remaut, H., et al., Structural basis for Ni transport and assembly of the urease active site by the metallo-chaperone UreE from *Bacillus pasteurii*. J Biol Chem, 2001. 15: p. 15.

232. Lee, M.H., et al., Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. Protein Sci, 1993. 2(6): p. 1042-52.

233. Colpas, G.J., et al., Identification of metal-binding residues in the *Klebsiella aerogenes* urease nickel metallochaperone, UreE. Biochemistry, 1999. 38(13): p. 4078-88.

234. Lee, M.H., et al., *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD* and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. J Bacteriol, 1992. 174(13): p. 4324-30.

235. Brayman, T.G. and R.P. Hausinger, Purification, characterization, and functional analysis of a truncated *Klebsiella aerogenes* UreE urease accessory protein lacking the histidine-rich carboxyl terminus. J Bacteriol, 1996. 178(18): p. 5410-6.

236. D'Orazio, S.E. and C.M. Collins, Characterization of a plasmid-encoded urease gene cluster found in members of the family Enterobacteriaceae. J Bacteriol, 1993. 175(6): p. 1860-4.

237. Dupuy, B., et al., *Clostridium perfringens* urease genes are plasmid borne. Infect Immun, 1997. 65(6): p. 2313-20.

238. Labigne, A., V. Cussac, and P. Courcoux, Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. J Bacteriol, 1991. 173(6): p. 1920-31.

239. Cussac, V., R.L. Ferrero, and A. Labigne, Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. J Bacteriol, 1992. 174(8):
p. 2466-73.

240. Solnick, J.V., et al., Molecular analysis of urease genes from a newly identified uncultured species of *Helicobacter*. Infect Immun, 1994. 62(5): p. 1631-8.

241. Beckwith, C.S., et al., Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. Infect Immun, 2001. 69(9): p. 5914-20.

242. Turbett, G.R., et al., Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals. Infect Immun, 1992. 60(12): p. 5259-66.

243. Maeda, M., et al., Cloning, sequencing, and expression of thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. 176(2): p. 432-42.

244. McMillan, D.J., M. Mau, and M.J. Walker, Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica*. Gene, 1998. 208(2): p. 243-51.

245. Scott, D.R., et al., Expression of the *Helicobacter pylori ureI* gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. Infect Immun, 2000. 68(2): p. 470-7.

246. Chen, Y.Y., K.A. Clancy, and R.A. Burne, *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque streptococcus. Infect Immun, 1996. 64(2): p. 585-92.

247. Skouloubris, S., et al., The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. Infect Immun, 1998. 66(9): p. 4517-21.

248. Weeks, D.L., et al., A H+-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science, 2000. 287(5452): p. 482-5.

249. Akada, J.K., et al., Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. Mol Microbiol, 2000. 36(5): p. 1071-84.

250. Island, M.D. and H.L. Mobley, *Proteus mirabilis* urease: operon fusion and linker insertion analysis of *ure* gene organization, regulation, and function. J Bacteriol, 1995. 177(19): p. 5653-60.

251. Chen, Y.Y., et al., Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.I urease operon. J Bacteriol, 1998. 180(21): p. 5769-75.

252. D'Orazio, S.E. and C.M. Collins, The plasmid-encoded urease gene cluster of the family *Enterobacteriaceae* is positively regulated by UreR, a member of the AraC family of transcriptional activators. J Bacteriol, 1993. 175(11): p. 3459-67.

253. Nicholson, E.B., et al., *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. J Bacteriol, 1993. 175(2): p. 465-73.

254. Poore, C.A., et al., Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. J Bacteriol, 2001. 183(15): p. 4526-35.

255. D'Orazio, S.E. and C.M. Collins, UreR activates transcription at multiple promoters within the plasmid- encoded urease locus of the *Enterobacteriaceae*. Mol Microbiol, 1995. 16(1): p. 145-55.

256. D'Orazio, S.E., V. Thomas, and C.M. Collins, Activation of transcription at divergent urea-dependent promoters by the urease gene regulator UreR. Mol Microbiol, 1996. 21(3): p. 643-55.

257. Thomas, V.J. and C.M. Collins, Identification of UreR binding sites in the *Enterobacteriaceae* plasmid- encoded and Proteus mirabilis urease gene operons. Mol Microbiol, 1999. 31(5): p. 1417-28.

258. Coker, C., O.O. Bakare, and H.L. Mobley, H-NS is a repressor of the *Proteus mirabilis* urease transcriptional activator gene *ureR*. J Bacteriol, 2000. 182(9): p. 2649-53.

259. Morou-Bermudez, E. and R.A. Burne, Analysis of urease expression in *Actinomyces naeslundii* WVU45. Infect Immun, 2000. 68(12): p. 6670-6.

260. Atkinson, M.R. and S.H. Fisher, Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1991. 173(1): p. 23-7.

261. Nolden, L., et al., Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes and investigation of activity. FEMS Microbiol Lett, 2000. 189(2): p. 305-10.

262. Collins, C.M., D.M. Gutman, and H. Laman, Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. Mol Microbiol, 1993. 8(1): p. 187-98.

263. Greenwood, J., et al., Physiological regulation, purification and properties of urease from *Methylophilus methylotrophus*. FEMS. Microbiol. Letter., 1998. 160: p. 131-135.

264. Clemens, D.L., B.Y. Lee, and M.A. Horwitz, Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. J Bacteriol, 1995. 177(19): p. 5644-52.

265. Mobley, H.L., M.D. Island, and R.P. Hausinger, Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev, 1995. 59(3): p. 451-80.

266. Masepohl, B., et al., Urea utilization in the phototrophic bacterium *Rhodobacter* capsulatus is regulated by the transcriptional activator NtrC. J Bacteriol, 2001. 183(2): p. 637-43.

267. Collier, J.L., B. Brahamsha, and B. Palenik, The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. Microbiology, 1999. 145(Pt 2): p. 447-59.

268. Wray, L.V., Jr., A.E. Ferson, and S.H. Fisher, Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. J Bacteriol, 1997. 179(17): p. 5494-501.

269. Puskas, L.G., M. Inui, and H. Yukawa, Structure of the urease operon of *Corynebacterium glutamicum*. DNA Seq, 2000. 11(5): p. 383-94.

270. de Koning-Ward, T.F. and R.M. Robins-Browne, A novel mechanism of urease regulation in *Yersinia enterocolitica*. FEMS Microbiol Lett, 1997. 147(2): p. 221-6.

271. Chen, Y.Y. and R.A. Burne, Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. FEMS Microbiol Lett, 1996. 135(2-3): p. 223-9.

272. Heimer, S.R., et al., Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* : evidence for regulation by Fur a trans-acting factor. Infect Immun, 2002. 70(2): p. 1027-1031.

273. Rohde, J.R., J.M. Fox, and S.A. Minnich, Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. Mol Microbiol, 1994. 12(2): p. 187-99.

274. Weaver, C.A., Y.Y. Chen, and R.A. Burne, Inactivation of the *ptsI* gene encoding enzyme I of the sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*: effects on growth and urease expression. Microbiology, 2000. 146(Pt 5): p. 1179-85.

275. Neidhardt, F.C., *Esherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Vol.1. 1996. 1149-1167.

276. Chen, Y.Y., T.H. Hall, and R.A. Burne, *Streptococcus salivarius* urease expression: involvement of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. FEMS Microbiol Lett, 1998. 165(1): p. 117-22.

277. van Vliet, A.H., et al., Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. Infect Immun, 2001. 69(8): p. 4891-7.

278. Burne, R.A. and Y.Y. Chen, Bacterial ureases in infectious diseases. Microbes Infect, 2000. 2(5): p. 533-42.

279. Chen, Y.Y., C.A. Weaver, and R.A. Burne, Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. J Bacteriol, 2000. 182(16): p. 4667-9.

280. Morou-Bermudez, E. and R.A. Burne, Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*. Infect Immun, 1999. 67(2): p. 504-12.

281. Clancy, K.A., et al., Characterization of recombinant, ureolytic *Streptococcus mutans* demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. Infect Immun, 2000. 68(5): p. 2621-9.

282. Kuwahara, H., et al., *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. Infect Immun, 2000. 68(8): p. 4378-83.

283. Igarashi, M., et al., Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. Infect Immun, 2001. 69(2): p. 816-21.

284. Krishnamurthy, P., et al., *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. Infect Immun, 1998. 66(11): p. 5060-6.

285. Eaton, K.A. and S. Krakowka, Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. Infect Immun, 1994. 62(9): p. 3604-7.
286. Makristathis, A., et al., Highly significant role of *Helicobacter pylori* urease in phagocytosis and production of oxygen metabolites by human granulocytes. J Infect Dis, 1998. 177(3): p. 803-6.

287. Mai, U.E., et al., Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. J Clin Invest, 1991. 87(3): p. 894-900.

288. Mai, U.E., et al., Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. J Exp Med, 1992. 175(2): p. 517-25.
289. Tanahashi, T., et al., Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. Infect Immun, 2000. 68(2): p. 664-71.

290. Harris, P.R., et al., *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. Gastroenterology, 1996. 111(2): p. 419-25.

291. Harris, P.R., et al., Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages. J Infect Dis, 1998. 178(5): p. 1516-20.

292. Fan, X., et al., *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. J Immunol, 2000. 165(4): p. 1918-24.

293. Johnson, D.E., et al., Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect Immun, 1993. 61(7): p. 2748-54.

294. Jones, B.D., et al., Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect Immun, 1990. 58(4): p. 1120-3.

295. Mobley, H.L., et al., Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. Infect Immun, 1991. 59(6): p. 2036-42.

296. Zhao, H., et al., Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic *Proteus mirabilis* during experimental ascending urinary tract infection. Infect Immun, 1998. 66(1): p. 330-5.

297. Monack, D.M. and S. Falkow, Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonization by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model. Mol Microbiol, 1993. 10(3): p. 545-53.

298. Reyrat, J.M., F.X. Berthet, and B. Gicquel, The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(19): p. 8768-72.

299. Bosse, J.T. and J.I. MacInnes, Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. Can J Vet Res, 2000. 64(3): p. 145-50.

300. Baltes, N., et al., *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. Infect Immun, 2001. 69(1): p. 472-8.
301. Watt, R.K. and P.W. Ludden, Nickel-binding proteins. Cell. Mol. Life. Sci., 1999. 56: p. 604-625.

302. Wu, L.F. and M.A. Mandrand-Berthelot, Genetic and physiological characterization of new *Escherichia* coli mutants impaired in hydrogenase activity. Biochimie, 1986. 68: p. 167-179.

303. Navarro, C., L.F. Wu, and M.A. Mandrand-Berthelot, The *nik* operon of *Eshcerichia coli* encodes a periplasmic-binding protein-dependent transport system for nickel. Mol. Mic., 1993. 9(6): p. 1181-1191.

304. De Pinna, K., et al., Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem., 1995. 227: p. 857-865.

305. Bosse, J.T., H.D. Gilmour, and J.I. MacInnes, Novel genes affecting urease acivity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Bacteriol, 2001. 183(4): p. 1242-7.

306. Park, K.S., et al., Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun, 2000. 68(10): p. 5742-8.

307. Jubier-Maurin, V., et al., Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity. J Bacteriol, 2001. 183(2): p. 426-34.

308. Eitinger, T. and M.A. Mandrand-Berthelot, Nickel transport systems in microorganisms. Arch Microbiol, 2000. 173(1): p. 1-9.

309. Mobley, H.L., R.M. Garner, and P. Bauerfeind, *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. Mol Microbiol, 1995. 16(1): p. 97-109.

310. Fu, C.S., et al., Bacterial genes involved in incorporation of nickel into a hydrogenase enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci., 1994. 91: p. 5099-5103.

311. Komeda, H., M. Kobayashi, and S. Shimizu, A novel transporter involved in cobalt uptake. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(1): p. 36-41.

312. Eitinger, T., et al., Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis. J Biol Chem, 2000. 275(24): p. 18029-33.

313. Wolfram, L., B. Friedrich, and T. Eitinger, The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediates nickel transport in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. 177(7): p. 1840-3.

314. Degen, O., et al., Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. Arch Microbiol, 1999. 171(3): p. 139-45.

315. Eitinger, T. and B. Friedrich, A topological model for the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*. Mol Microbiol, 1994. 12(6): p. 1025-32.

316. Fulkerson, J.F., Jr., R.M. Garner, and H.L. Mobley, Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. J Biol Chem, 1998. 273(1): p. 235-41.

317. Fulkerson, J.F., Jr. and H.L. Mobley, Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. J Bacteriol, 2000. 182(6): p. 1722-30.

318. Eitinger, T., et al., A Ni2+ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. J. Biol. Chem., 1997. 27: p. 17139-17144.

319. Wolfram, L. and P. Bauerfeind, Conserved low affinity nickel-binding amino acids are essential for the function of the nickel permease NixA of Helicobacter pylori. J. Bacteriol., 2002. 184(5): p. 1438-1443.

320. Wu, L.F., et al., Nickel deficiency give rise to the defective hydrogenase phenotype of hydC and *fnr* mutants in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 1989. 3: p. 1709-1718.

321. De Pinna, K., et al., Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickelresponsive regulator in *Eshcerichia coli*. J. Bacteriol., 1998. 181(2): p. 670-674.

322. Chivers, P.T. and R.T. Sauer, Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. J. Biol. Chem., 2000. 275: p. 19735-19741.

323. Chivers, P.T. and R.T. Sauer, Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. J. Biol. Chem., 2000. 275: p. 19735-19741.

324. Finkelstein, A., Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. J Gen Physiol, 1976. 68(2): p. 127-35.

325. Galluci, E.S., S. Micelli, and C. Lippe, Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. Arch. Int. Physiol. Biochim., 1971. 79: p. 881-887.

326. Lippe, C., Urea and thiurea permeabilities of phospholipid and cholesterol bilayer membranes. J. Mol. Biol., 1969. 39: p. 669-672.

327. Pugh, E.L., et al., Comparison of steady-state fluorescence polarization and urea permeability of phosphatidylcholine and phosphatidylsulfocholine liposomes as a function of sterol structure. Chem Phys Lipids, 1989. 50(1): p. 43-50.

328. Murdaugh, H.V., E.D. Robin, and C.D. Hearn, Urea : apparent carrier-mediated transport by facilitated transport diffusion in dogfish erythrocytes. Science, 1964. 144: p. 52-53.

329. Levitt, D.G. and M. H.J., Reflection coefficient and permeability of urea and ethylene glycol in the human red cell membrane. The J. of General Physiol., 1983. 81: p. 239-253.

330. Mayrand, R.R. and D.G. Levitt, Urea and ethylen glycol-facilited transport systems in the human red cell membrane. Saturation, competition and asymetry. J. Gen. Physiol., 1983. 81: p. 221-237.

331. Hasegawa, H. and A.S. Verkman, Functional expression of cAMP-dependent and independent urea transporters in Xenopus oocytes. Am J Physiol, 1993. 265(2 Pt 1): p. C514-20.

332. You, G., et al., Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. Nature, 1993. 365(6449): p. 844-7.

333. Sands, J.M., R.T. Timmer, and R.B. Gunn, Urea transporters in kidney and erythrocytes. Am J Physiol, 1997. 273(3 Pt 2): p. F321-39.

334. Shayakul, C., A. Steel, and M.A. Hediger, Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. J Clin Invest, 1996. 98(11): p. 2580-7.

335. Karakashian, A., et al., Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(2): p. 230-7.

336. Couriaud, C., P. Ripoche, and G. Rousselet, Cloning and functional characterization of a rat urea transporter: expression in the brain. Biochim Biophys Acta, 1996. 1309(3): p. 197-9.

337. Rousselet, G., P. Ripoche, and P. Bailly, Tandem sequence repeats in urea transporters: identification of an urea transporter signature sequence. Am J Physiol, 1996. 270(3 Pt 2): p. F554-5.

338. Nielsen, S., et al., Cellular and subcellular localization of the vasopressin- regulated urea transporter in rat kidney. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(11): p. 5495-500.

339. Olives, B., et al., Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. J Biol Chem, 1995. 270(26): p. 15607-10.

340. Bagnasco, S.M., Urea: new questions about an ancient solute. J Nephrol, 2000. 13(4): p.260-6.

341. Bury-Monet, S., et al., The *Helicobacter* UreI protein : role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. Mol. Microbiol., 2001. 42: p. 1021-34.

342. Rektorschek, M., et al., Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier. Mol Microbiol, 2000. 36(1): p. 141-52.

343. Weeks, D.L. and G. Sachs, Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter* pylori. Mol Microbiol, 2001. 40(6): p. 1249-59.

344. Heller, H.B., E.C. Lin, and T.H. Wilson, Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1980. 144: p. 274-8.

345. Katz, U. and Y. Ben-Sasson, A possible role of the kidney and urinary bladder in urea conservation of *Bufo viridis* under high salt acclimation. J Exp Biol, 1984. 109: p. 373-7.

208

346. Rapport, J., C. Chaimovitz, and R.M. Hay, Active urea transport in toad skin is coupled to H+ gradients. Am. J. Physiol., 1989. 256: p. F830-F835.

347. Lacoste, I., et al., Active urea transport independent of H+ and Na+ transport in frog skin epithelium. Am J Physiol, 1991. 261(4 Pt 2): p. R898-906.

348. ElBerry, H.M., et al., Regulation of the urea active transporter gene (DUR3) in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol, 1993. 175(15): p. 4688-98.

349. Jahns, T., et al., Evidence for carrier-mediated, energy-dependent uptake of urea in some bacteria. Arch. Microb., 1988. 149: p. 377-383.

350. Jahns, T. and H. Kaltwasser, Energy-dependent uptake of urea by *Bacillus megaterium*. FEMS Microbiol Lett, 1989. 48(1): p. 13-7.

351. Jahns, T., Regulation of urea uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1992. 62(3): p. 173-9.

352. Siewe, R.M., et al., Urea uptake and urease activity in *Corynebacterium glutamicum*. Arch Microbiol, 1998. 169(5): p. 411-6.

353. Mills, J., et al., Characterisation of a binding-protein-dependent, active transport system for short-chain amides and urea in the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. Eur J Biochem, 1998. 251(1-2): p. 45-53.

354. Riot, B., P. Berche, and M. Simonet, Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. Infect Immun, 1997. 65(5): p. 1985-90.

355. Henderson, I.R., P. Owen, and J.P. Nataro, Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. Mol Microbiol, 1999. 33(5): p. 919-32.

356. Newman, E.B. and R. Lin, Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu Rev Microbiol, 1995. 49: p. 747-75.

357. Young, G.M., D. Amid, and V.L. Miller, A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. J Bacteriol, 1996. 178(22): p. 6487-95.

358. Bosse, J.T. and J.I. MacInnes, Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. Infect Immun, 1997. 65(11): p. 4389-94.

359. Jahns, T., U. Schafer, and H. Kaltwasser, Heat-stable ureases from two filamentous cyanobacterium. Microbiology, 1995. 141: p. 737-741.

360. Argall, M.E., et al., Purification and properties of urease from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Biochem Int, 1992. 27(6): p. 1027-36.

361. Rai, A.K., Purification and properties of urease from a cyanobacteriul *Anabaena doliolum*. FEMS Microbiol. Lett., 1989. 61: p. 319-322.

362. Ge, X., K. Cain, and R. Hirschberg, Urease metabolism and regulation in the cyanobacterium *Anabeana variabilis*. Can. J. Microbiol., 1990. 36: p. 218-222.

363. Miyagawa, K., et al., Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. J Biotechnol, 1999. 68(2-3): p. 227-36.

364. Schneider, J. and H. Kaltwasser, Urease from *Arthrobacter oxydans*, nickel-containing enzyme. Arch. Microbiol., 1984. 139: p. 355-360.

365. Christians, S. and H. Kaltwasser, Nickel-content of urease from *Bacillus pasteurii*. Arch Microbiol, 1986. 145(1): p. 51-5.

366. Nakano, H., S. Takenishi, and Y. Watanabe, Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes*. Agric. Biol. Chem., 1984. 48: p. 1495-1502.

367. Todd, M.J. and R.P. Hausinger, Purification and characterization of the nickelcontaining multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. J Biol Chem, 1987. 262(13): p. 5963-7. 368. Lee, M.H., S.B. Mulrooney, and R.P. Hausinger, Purification, characterization, and in vivo reconstitution of *Klebsiella aerogenes* urease apoenzyme. J Bacteriol, 1990. 172(8): p. 4427-31.

369. Mobley, H.L., et al., Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1988. 26(5): p. 831-6.

370. Kakimoto, S., et al., Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. Appl Microbiol Biotechnol, 1990. 32(5): p. 538-43.

371. Wong, B.L. and C.R. Shobe, Single-step purification of urease by affinity chromatography. Can J Microbiol, 1974. 20(4): p. 623-30.

372. Mobley, H.L., B.D. Jones, and J.L. Penner, Urease activity of *Proteus penneri*. J Clin Microbiol, 1987. 25(12): p. 2302-5.

373. Magana-Plaza, I., C. Montes, and J. Ruiz-Herrera, Purification and biochemical characteristics of urease from *Proteus rettgeri*. Biochim Biophys Acta, 1971. 242(1): p. 230-7.

374. Murooney, S.B., et al., Purification, characterization, and genetic organization of recombinant *Providencia stuartii* urease expressed in *Escherichia coli*. J. bacteriol., 1988. 170: p. 2202-2207.

375. Hausinger, R.P., Purification of a nickel-containing urease from the rumen anaerobe *Selenomonas ruminantium*. J Biol Chem, 1986. 261(17): p. 7866-70.

376. Glemzha, A.A., K. V.B., and D.Y. Yodvalkite, Urease from *Staphylococcus saprophiticus*. Some propreties and inhibition by metal ions. Biochemstry, 1986. 49: p. 1741-1745.

377. Eng, H., J.A. Robertson, and G.W. Stemke, Properties of urease from *Ureaplasma urealyticum*: kinetics, molecular weight, and demonstration of multiple enzyme isoelectric point forms. Can J Microbiol, 1986. 32(6): p. 487-93.

211

PPN 069 409 323

# Résumé

L'uréase est une métallo-enzyme à nickel très répandue chez les procaryotes. Elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en ions ammonium et carbamate. Sa biogenèse implique des gènes de structure dont les produits donnent naissance, après assemblage, à une enzyme inactive (apouréase) et des gènes auxiliaires qui codent des protéines activant l'apouréase par fixation de nickel. Yersinia pseudotuberculosis et Yersinia enterocolitica produisent une uréase dont la synthèse est régie par trois gènes de structure (ureA, ureB et ureC) et quatre gènes auxiliaires (ureE, ureF, ureG et ureD) orientés dans la même direction sur le chromosome. Yersinia pestis possède un locus ure homologue et nous avons démontré qu'il est très proche de celui de Y. pseudotuberculosis (>99,6% et 98,6% d'identité nucléotidique pour respectivement les gènes de structure et auxiliaires). Nous avons caractérisé l'environnement génétique en amont et en aval du locus ure de Y. pseudotuberculosis. En amont de ureA est présent un opéron constitué de cinq gènes, vntA, vntB, yntC,yntD et yntE, qui code un transporteur de nickel de type ABC. Le dernier gène du locus ure, ureD, précède yut qui code un transporteur spécifique d'urée d'un nouveau type. Ce dernier est lui-même suivi de ureH qui spécifie un autre transporteur de nickel. Des gènes très fortement homologues à vnt, vut et ureH encadrent également, selon le même arrangement, le locus uréase de Y. pestis et Y. enterocolitica. Bien que Y. pestis soit pourvue du même équipement génétique que Y. pseudotuberculosis, cette bactérie n'est pas uréolytique. Nous avons montré que ce trait phénotypique résulte d'une mutation ponctuelle dans ureD, à l'origine d'une protéine UreD tronquée qui est dépourvue d'activité biologique.

#### Title

Genetic characterization of the urease locus from Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis

# Abstract

Urease is a nickel metallo-enzyme which is commonly found among procaryotes. Urease catalyze hydrolysis of urea to ammonia and carbonic acid. Several genes, including structural genes and accessory genes are required for a catalytically active urease. The structural genes encode an inactive apo-enzyme and the accessory genes encode proteins necessary for incorporation of the nickel ions into the apo-enzyme. In Yersinia pseudotuberculosis and Y. enterocolitica, three structural genes (ureA, ureB and ureC) and four accessory genes (ureE, ureF, ureG and ureD) oriented in the same order and polarity have been characterized in the chromosomal urease locus (ure). Y. pestis exhibites a homologous ure locus since we demonstrated that it displayed >99.6% and 98.6% nucleotide identities with the structural genes and accessory genes from Y. pseudotuberculosis, respectively. We characterized the upstream and downstream regions of the ure locus from Y. pseudotuberculosis. An ABC transporter operon composed of five genes (yntA, yntB, yntD and yntE) was found to be located upstream from the ureA gene. Furthermore, a new member (yut) of the specific urea transporter family, which is situated between the ureD and ureH genes, was identified in the ure locus. Finally, we showed that the ureH product corresponded to another nickel transporter. Homologous ynt, yut and ureH genes displaying the same organization were observed in the urease locus from Y. pestis and Y. enterocolitica. Although Y. pestis harbors an urease locus, this species is not ureolytic. We demonstrated that the absence of urease activity in Y. pestis resulted from a non sens mutation in the *ureD* gene leading to premature termination that caused a truncated *ureD* protein with no activity.

#### Discipline

Biologie et Santé

#### **Mots-Clefs**

Uréase, Yersinia, variation de phase, transporteur de nickel, transporteur d'urée

### Laboratoire de rattachement

Laboratoire d'Etude des interactions cellulaires et moléculaires des bactéries pathogènes avec l'hôte Equipe mixte Inserm-Univ Lille2- EPI9919 & JE2225 Institut de Biologie de Lille 1, rue du professeur Calmette BP 245 59019 Lille cedex