

Université de Montréal

**Influence du microbiote intestinal sur le métabolisme et la virulence des
Escherichia coli entérohémorragiques**

par

Guillaume Le Bihan

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine Vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Janvier 2015

© Guillaume Le Bihan, 2015

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**Influence du microbiote intestinal sur le métabolisme et la virulence des
Escherichia coli entérohémorragiques**

Présentée par

Guillaume Le Bihan

A été évaluée par le jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Mario Jacques

Directrice de recherche : Josée Harel

Codirecteur : Grégory Jubelin

Membre du jury : France Daigle

Examineur externe : Sébastien P. Faucher

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) représentent un problème majeur de santé publique dans les pays développés. Les EHEC sont régulièrement responsables de toxi-infections alimentaires graves chez l'humain et causent des colites hémorragiques et le symptôme hémolytique et urémique, mortel chez les enfants en bas âge. Les EHEC les plus virulents appartiennent au sérotype O157:H7 et le bovin constitue leur réservoir naturel. À ce jour il n'existe aucun traitement pour éviter l'apparition des symptômes liés à une infection à EHEC. Par conséquent, il est important d'augmenter nos connaissances sur les mécanismes employés par le pathogène pour réguler sa virulence et coloniser efficacement la niche intestinale.

Dans un premier temps, l'adaptation de la souche EHEC O157:H7 EDL933 à l'activité métabolique du microbiote intestinal a été étudiée au niveau transcriptionnel. Pour se faire, EDL933 a été cultivée dans les contenus caecaux de rats axéniques (milieu GFC) et dans ceux provenant de rats colonisés par le microbiote intestinal humain (milieu HMC). Le HMC est un milieu cécocal conditionné *in vivo* par le microbiote. Dans le HMC par rapport au GFC, EDL933 change drastiquement de profil métabolique en réponse à l'activité du microbiote et cela se traduit par une diminution de l'expression des voies de la glycolyse et une activation des voies de l'anaplérose (voies métaboliques dont le rôle est d'approvisionner le cycle TCA en intermédiaires métaboliques). Ces résultats, couplés avec une analyse métabolomique ciblée sur plusieurs composés, ont révélé la carence en nutriments rencontrée par le pathogène dans le HMC et les stratégies métaboliques utilisées pour s'adapter au microbiote intestinal. De plus, l'expression des gènes de virulence incluant les gènes du locus d'effacement des entérocytes (LEE) codant pour le système de sécrétion de type III sont réprimés dans le HMC par rapport au GFC indiquant la capacité du microbiote intestinal à réprimer la virulence des EHEC.

L'influence de plusieurs composés intestinaux présents dans les contenus caecaux de rats sur l'expression des gènes de virulence d'EDL933 a ensuite été étudiée. Ces résultats ont démontré que deux composés, l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et le N-acétylglucosamine (GlcNAc) répriment l'expression des gènes du LEE. La répression induite par ces composés s'effectue via NagC, le senseur du GlcNAc-6-P intracellulaire et le régulateur du catabolisme du GlcNAc et du galactose chez *E. coli*. NagC est un régulateur transcriptionnel inactivé en présence de GlcNAc-6-P qui dérive du catabolisme du Neu5Ac et du transport GlcNAc. Ce travail nous a permis d'identifier NagC comme un activateur des gènes du LEE et de mettre à jour un nouveau mécanisme qui permet la synchronisation de la virulence avec le métabolisme chez les EHEC O157:H7. La concentration du Neu5Ac et du GlcNAc est augmentée *in vivo* chez le rat par le symbiote humain *Bacteroides thetaiotaomicron*, indiquant la capacité de certaines espèces du microbiote intestinal à relâcher les composés répresseurs de la virulence des pathogènes.

Ce travail a permis l'identification des adaptations métaboliques des EHEC O157:H7 en réponse au microbiote intestinal ainsi que la découverte d'un nouveau mécanisme de régulation de la virulence en réponse au métabolisme. Ces données peuvent contribuer à l'élaboration de nouvelles approches visant à limiter les infections à EHEC.

Mots clés

Escherichia coli entérohémorragique; Microbiote intestinal; Adaptation; Métabolisme; Virulence; Régulation

Abstract

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) represent an important public threat especially in developed countries. EHEC are human pathogens involved in food- and water-borne outbreaks and the cause of hemorrhagic colitis and the hemolytic and uremic syndrome that is deadly to young children. The serotype O157:H7 contains the most virulent strain of EHEC and bovines are their natural reservoir. To date, no cure exists to avoid symptoms of an EHEC infection. Consequently, it is of interest to enhance our knowledge about mechanisms used by the pathogen to regulate virulence and to efficiently colonize the intestinal tract.

The adaptive response of EHEC O157:H7 strain EDL933 to the metabolic activity of the human intestinal microbiota was first analysed at the transcriptional level. The strain EDL933 was grown in the cecal content of germ-free rats (GFC medium) and that of rats associated with the human intestinal microbiota (HMC medium). The HMC medium is an *in vivo* microbiota-conditioned medium. An important shift in the metabolic profile of EDL933 was observed in HMC as compared to GFC, with a decreased expression of genes involved in the glycolysis pathways and an increased expression of anaplerosis genes. These results, together with a targeted metabolomics analysis, revealed the nutrient starvation encounters by the pathogen in HMC and the metabolic strategies used to adapt the intestinal microbiota. Moreover, the expression of several virulence genes including those of the locus of enterocyte effacement (LEE) encoding for the type III secretion system was decreased, indicating the ability of the intestinal microbiota to decrease virulence expression of pathogens.

The influence of several intestinal compounds present in the cecal contents of rats was then tested for their ability to modulate the virulence gene expression of EDL933. Results demonstrated that the two compounds, N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-acetylglucosamine (GlcNAc) down-regulate the expression of the LEE genes. This repression was dependant of the protein NagC which is the sensor of intracellular GlcNAc-6-P and the regulator of the GlcNAc and the

galactose catabolism in *E. coli*. NagC is a transcriptional regulator that is inactivated in presence of GlcNAc-6-P derived from the Neu5Ac catabolism and the GlcNAc transport. This work led to the identification of NagC as an activator of the LEE genes and the discovery of a new mechanism involved in the coordination of virulence and metabolism in EHEC O157:H7. The concentration of Neu5Ac and GlcNAc was enhance *in vivo* by the human intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* indicating the ability of some species of the microbiota to release compounds that repress virulence of pathogens.

This work led to the identification of the metabolic adaptive responses of EHEC O157:H7 in the intestinal milieu conditioned by the intestinal microbiota and the discovery of a new mechanism used to coordinate metabolism and virulence. These data could contribute to the development of news approaches leading to decrease EHEC infections.

Keywords

Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Intestinal microbiota; Adaptive response; Metabolism; Virulence; Regulation

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Abréviations	xiii
Remerciements	xv
Section I- Introduction.....	xvii
Section II- Revue de littérature	1
1. Les EHEC O157:H7	2
1.1. Les EHEC et autres <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux	2
1.2. Le sérotype O157:H7	5
1.3. Réservoir et vecteur de transmission.....	7
1.4. Symptomatologie	10
1.5. Épidémies de grande ampleur	12
1.6. Traitements.....	13
2. Les facteurs de virulence	14
2.1. Les facteurs d'adhésion.....	15
2.1.1. Le SST3	15
2.1.1.1. Les lésions attachantes et effaçantes	15
2.1.1.2. Structure	16
2.1.1.3. Les effecteurs	18
2.1.1.4. Le locus d'effacement des entérocytes	21
2.1.1.5. Régulation transcriptionnelle	22
2.1.1.6. Régulation post-transcriptionnelle	29
2.1.1.7. Chronologie dans la sécrétion des effecteurs	30
2.1.2. Autres facteurs d'adhérence	31
2.2. La Shiga toxine	32
2.2.1. Types et sous-types de Stx	32
2.2.2. Structure et mode d'action.....	33
2.2.3. Régulation génétique	34
2.3. Autres facteurs de virulence.....	38

3.	Niche écologique et nutritionnelle des EHEC chez les mammifères	39
3.1.	Niche écologique.....	39
3.1.1.	Chez le bovin.....	39
3.1.2.	Dans le modèle souris.....	40
3.2.	Niche nutritionnelle.....	41
3.2.1.	Les sucres dérivés de la mucine	41
3.2.2.	Les substrats de la néoglucogenèse	43
3.2.3.	L'éthanolamine.....	43
4.	Le microbiote intestinal humain.....	44
4.1.	Composition.....	44
4.2.	Rôles physiologiques	46
4.2.1.	La digestion	46
4.2.1.1.	Dégradation des polysaccharides	46
4.2.1.2.	Production des acides gras volatiles (AGV)	46
4.2.2.	Synthèse de vitamines	47
4.2.3.	Vascularisation intestinale.....	47
4.2.4.	Résistance à la colonisation intestinale des pathogènes	48
4.2.4.1.	Régulation de l'immunité.....	48
4.2.4.2.	Production de bactériocines	49
4.2.4.3.	Compétition nutritionnelle	49
4.2.5.	Influence sur la virulence des pathogènes	51
4.3.	Déséquilibre du microbiote intestinal	54
4.4.	Composition et activité métabolique du microbiote intestinal humain chez le rat	54
	Problématique et objectifs	56
	Section III- Méthodologie et Résultats.....	57
1.	Article I.....	59
1.1.	Abstract	61
1.2.	Introduction	62
1.3.	Results	64
1.4.	Discussion	69
1.5.	Experimental procedures.....	75

1.6.	Acknowledgments	79
1.7.	References	80
1.8.	Legends	85
1.9.	Supporting information	92
2.	Article II :	99
2.1.	Abstract	101
2.2.	Introduction	101
2.3.	Results	103
2.4.	Experimental procedures.....	113
2.5.	Acknowledgments.....	119
2.6.	References	120
2.7.	Legends	124
2.8.	Supporting information	137
	Section IV- Discussion - Conclusions.....	141
1.	Discussion.....	142
1.1.	Modèle expérimental pour l'étude de l'effet du microbiote	143
1.2.	Réactions anaplérotiques induites en réponse à l'activité du microbiote intestinal	145
1.3.	Le microbiote intestinal réprime l'expression des gènes de virulence des EHEC	147
1.4.	Rôle du catabolisme du Neu5Ac et le GlcNAc et de NagC dans la régulation de la virulence des EHEC	149
1.4.1.	Origine du Neu5Ac et du GlcNAc	151
1.4.2.	NagC coordonne la virulence avec le métabolisme.....	153
1.4.3.	Rôle de NagC dans le co-métabolisme des sucres dérivées de la mucine	155
1.4.4.	NagC est-il impliqué dans la répression des gènes du LEE dans le BTC?.....	157
1.4.5.	Mécanistique de la régulation par NagC	158
1.5.	NagC, un activateur général de l'adhésion?.....	162
1.6.	Pourquoi réprimer l'expression des gènes de SST3?.....	163
2.	Conclusion	167
	Section V- Bibliographie.....	169
	Annexes	xvii
1.	Annexe 1: méthodologie et résultats supplémentaires	xxi

1.1.	Effect of intestinal compounds on the activity of the <i>ler</i> promoter	xxi
1.2.	Regulation of <i>z2210</i> by NagC	xxiii
1.3.	Binding of NagC on the promoter of <i>ler</i>	xxiv
1.3.1.	Material and methods	xxiv
1.3.1.1.	Electrophoretic mobility shift assay	xxiv
1.3.1.2.	Footprinting.....	xxv
1.3.2.	Results	xxv
2.	Annexe 2: Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> O78 strain	xxix
3.	Annexe 3: The Pho regulon and the pathogenesis of <i>Escherichia coli</i>	xxviii

Liste des tableaux

Section II-Revue de littérature

Tableau I. Identification des sérogroupes de STEC non-O157 impliqués dans des infections humaines dans 17 pays industrialisés entre 1982 et 2003	6
Tableau II. Classification des STEC en séropathotypes	6

Section III : Méthodologie et résultats

Article I :

Table 1. Microarray and qRT-PCR data representing EHEC EDL933 significantly differentially expressed genes in HMC	90
Supplementary Table 1. List of primers used in the qRT-PCR experiments	94
Supplementary Table 2. Normalized microarray data	96
Supplementary Table 3. GO categories of differentially expressed genes involved in the central metabolism and the catabolism of carbon and nitrogen sources, and their respective enrichment scores as calculated by DAVID	97

Article II :

Supplementary table 1. Bacterial strains and plasmids	137
Supplementary table 2. list of primers used in this study	139

Liste des figures

Section II- Revue de littérature

Figure 1. Schémas des stratégies d'adhérence à l'épithélium intestinal des différents pathovars d' <i>E. coli</i> pathogènes entériques	4
Figure 2. Réservoir et modes de transmission des EHEC à l'humain	10
Figure 3. Évolution clinique d'une infection à EHEC O157:H7	12
Figure 4. Lésion A/E	16
Figure 5. Schéma du système de sécrétion de type III	17
Figure 6. Sécrétion par le SST3 des effecteurs au sein de la cellule hôte	20
Figure 7. Organisation génétique du LEE	21
Figure 8. Schéma général de la régulation des gènes du LEE chez les EHEC	31
Figure 9. Mode d'action de la Shiga toxine	34
Figure 10. Région régulatrice de la lysogénie et de l'entrée en phase lytique des phages de type lambda codant pour les gènes <i>stx</i>	37
Figure 11. Concentration bactérienne dans le tractus intestinal humain	45
Figure 12. Mécanismes de résistance à la colonisation des pathogènes intestinaux	53

Section III : Méthodologie et résultats

Article I :

Figure 1. Functional classification of differentially expressed genes in HMC as compared to GFC	87
Figure 2. Schematic representation of the metabolic adaptation of <i>E. coli</i> EDL933 in HMC	88
Figure 3. Concentrations of lactose, ribose, Neu5Ac, lactate, ethanolamine and L-tryptophan in GFC and HMC as measured by HPLC-SRM MS	89
Supplementary Figure 1. <i>In vitro</i> <i>E. coli</i> EDL933 growth in GFC and HMC	93

Article II

Figure 1. Neu5Ac and GlcNAc regulate LEE expression	129
Figure 2. Adhesion of EDL933 to HeLa cells	130
Figure 3. NagC activates the LEE genes expression	131
Figure 4. NagC represses the expression of <i>nagB</i> , <i>nagE</i> and <i>galP</i>	132
Figure 5. The NagC mutant is outcompeted by the WT strain during infection	133
Figure 6. Analyse of the NagC binding on the promoter of <i>ler</i>	134
Figure 7. Analyses of the Neu5Ac and the GlcNAc concentrations and the genetic regulation in EDL933 in the BTC	135
Figure 8. Model for the regulation of the metabolism and the LEE genes by NagC	136

Section IV-Discussion - Conclusion

Figure 1. Représentation schématique des voies de catabolisme du Neu5Ac et du GlcNAc	151
Figure 2. Représentation schématique de la structure des oligosaccharides retrouvés dans le colon humain	153
Figure 3. Modèle de régulation de la virulence et du métabolisme par NagC	155
Figure 4. Modèle de régulation du co-métabolisme par NagC chez <i>E. coli</i>	157
Figure 5. Séquence logo déterminées à partir des sites de fixation de NagC chez EDL933	159
Figure 6. Représentation des séquences de fixation de NagC chez EDL933	160
Figure 7. Représentation schématique du promoteur du LEE1 et des sites de fixation à l'ADN des régulateurs directs de l'expression de <i>ler</i>	161
Figure 8. Modèle de relocalisation intestinal des EHEC O157:H7 en fonction de la concentration en Neu5Ac et GlcNAc	166

Annexes

Figure 1. Screening of intestinal compounds for the ability to influence the activity of Pleel1	xxii
Figure 2. NagC is a transcriptional repressor of <i>z2210</i> encoding a putative sulfatase	xxiii
Figure 3. Binding of NagC to the promoter of <i>ler</i>	xxvii
Figure 4. DNase footprinting assays	xxviii

Abréviations

3HCI : « 3-hydroxycinnamic acid »

3HPP : « 3-hydroxyphenylpropionic acid »

ADN : acide désoxyribonucléique

AGV : acides gras volatiles

AHLs : acyl-homoserine lactones

AI-3 : autoinducteur 3

AIEC : « adhérent-invasive *E. coli* »

AMPs : « antimicrobial peptides » ou peptides antimicrobiens

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

BP-933W : bactériophage 933W

BSIC : « bovine small intestinal content » ou contenu du petit intestin bovin

BTC : « *B. thetaiotaomicron* associated rat's cecal content » ou contenu cécal de rats associés à *B. thetaiotaomicron*

cycle TCA : « tricarboxylic acid cycle » ou cycle de Krebs

DAEC : « diffusely adherent *E. coli* » ou *E. coli* à adhérence diffuse

EA : éthanolamine

EAEC : « enteroaggregative *E. coli* » ou *E. coli* entéroaggrégatives

EHEC : « enterohaemorrhagic *E. coli* » ou *E. coli* entérohémorragiques

EIEC : « enteroinvasives *E. coli* » ou *E. coli* entéroinvasives

EPEC : « enteropathogenic *E. coli* » ou *E. coli* entéropathogènes

ETEC : « enterotoxigéniques *E. coli* » ou *E. coli* entérotoxigéniques

GalNAc : N-acétylgalactosamine

Gb3 : globotriaosylceramide

GFC : « germ-free rat's cecal content » ou contenu cécal de rats axéniques

GlcNAc : N-acetylglucosamine

HMC : « human microbiota-associated rat's cecal content » ou contenu cécal de rats associées au microbiote intestinal humain

H-NS : « histone-like nucleoid structuring protein »

IHF : « integrated Host Factor »

LEE : « locus of enterocyte effacement » ou locus d'effacement des entérocytes

Ler : « LEE-encoded regulator »

lésions A/E : lésions attachantes et effaçantes

LPF : « long polar fimbriae »

Neu5Ac : N-acetylneuraminic acid

Nle : « non-LEE encoded effectors »

NO : « nitric oxide » ou oxyde nitrique

pili HCP : « hemorrhagic coli pilus »

pili Bfp : « bundle-forming pili »

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

SHU : syndrome hémolytique et urémique

SST3 : système de sécrétion de type III

STEC : « Shiga-toxin producing *E. coli* » ou *E. coli* producteur de la Shiga toxine

Stx : Shiga toxine

T3S : « type III secreted »

UPEC : « uropathogenic *E. coli* » ou *E. coli* uropathogène

Remerciements

Je remercie chaleureusement Josée Harel que j'ai eu la chance d'avoir comme directrice. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, de m'avoir encadré et d'avoir été à l'écoute. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre enthousiasme et votre sens critique. Tout cela m'a permis d'évoluer positivement tout au long de mon doctorat et d'atteindre mes objectifs.

Je tiens à remercier sincèrement Christine Martin pour avoir été ma codirectrice, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de l'INRA de Clermont-Ferrand-Theix et pour m'avoir fait découvrir la magnifique région d'Auvergne.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers Grégory Jubelin. Merci Grégory d'avoir accepté de devenir mon second codirecteur. Ce fût un réel plaisir pour moi que de travailler ensemble. Cela fût très enrichissant.

Je remercie France Daigle et Michael Mourez pour avoir fait partie de mon comité conseil. Merci à vous pour vos critiques et vos suggestions qui ont contribué à l'avancement de ce projet. Merci Michael d'avoir été à l'écoute.

Je remercie mes collègues actuels et anciens. Merci pour le partage, pour l'entraide, pour la bonne humeur et pour toutes ces réflexions à propos de notre avenir professionnel. Je remercie particulièrement Philippe Garneau pour son aide précieuse et son dévouement au travail. À tous, je vous souhaite bonne chance.

Merci à l'ensemble des membres du GREMIP, du CRIPA et à tous ceux qui contribuent à la dynamique de groupe, au bien-être et à la réussite des étudiants.

Un grand merci à mes parents pour qui il n'a pas été facile de voir partir leur enfant à l'étranger. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises. Merci pour votre compréhension et votre soutien.

Finalement, je remercie de tout cœur Christine, ma conjointe. Je te remercie d'avoir été si forte dans ce que tu as traversé. Cela m'a permis d'avancer et d'aboutir. Merci pour ta compréhension et ton soutien au quotidien. Je dédicace cette thèse à notre enfant, Mathéo.

Section I- Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est un bacille à Gram-négatif, anaérobie facultatif, appartenant à la famille des Entérobactéries. Isolée à partir des selles de nourrissons par le docteur Theodore Escherich en 1885, *E. coli* demeure parmi les bactéries les plus étudiées. Outre son utilisation fréquente comme outil de laboratoire en biologie moléculaire, *E. coli* est devenue un véritable modèle de référence dans plusieurs domaines d'étude incluant celui des interactions entre l'homme et les bactéries. *E. coli* est en général une bactérie commensale hébergée dans le tractus intestinal de l'homme et plus globalement des animaux à sang chaud, ces derniers étant colonisés par *E. coli* dès leur naissance. Les Entérobactéries sont sous-représentées au sein du microbiote intestinal [1]. Néanmoins, *E. coli* est capable de demeurer dans le tractus intestinal et reste la plus abondante des aérobie intestinaux. De plus, *E. coli* en symbiose avec son hôte peut lui apporter plusieurs bénéfices tel que la protection contre la colonisation intestinale de bactéries pathogènes ou bien la synthèse de la vitamine K [2-4]. Cependant, plusieurs souches d'*E. coli* ont acquis des éléments génétiques leur permettant de produire des facteurs de virulence, de s'adapter à de nouvelles niches et ainsi causer la maladie chez l'homme.

Parmi les souches pathogènes, les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des *E. coli* producteurs de la Shiga toxine (STEC) et sont impliqués dans des cas de toxi-infections alimentaires graves dans les pays industrialisés. Identifiés comme la cause de colites hémorragiques chez l'homme en 1982, les EHEC sont responsables de diarrhées sanglantes et du développement du syndrome hémolytique et urémique (SHU), souvent mortel pour les enfants en bas âge et les personnes âgées. La production de la Shiga toxine est responsable du développement du SHU. Le sérotype O157:H7 est le plus représenté dans les cas de toxi-infections alimentaires graves causées par les EHEC. Comme beaucoup d'EHEC, les EHEC de sérotype O157:H7 produisent un système de sécrétion de type III (SST3) et plusieurs effecteurs qui confèrent à la bactérie la capacité de se lier intimement aux cellules épithéliales du colon et de causer une diarrhée aqueuse chez l'homme. Les bovins sont porteurs asymptomatiques des EHEC et

sont leur réservoir principal. Par conséquent, les bovins représentent une source principale de contamination aux EHEC.

Les EHEC sont capables de coloniser le tractus intestinal humain où elles produisent de nombreux facteurs de virulence causant la maladie chez l'homme. La capacité à coloniser le tractus intestinal réside en la capacité de la bactérie pathogène à survivre aux conditions physico-chimiques de l'environnement, à trouver une niche nutritionnelle dans un milieu occupé par le microbiote intestinal et à avoir une régulation optimale de ses facteurs de virulence. Dans le contenu intestinal bovin et plus précisément dans le contenu du petit intestin, les EHEC O157:H7 sont capables de consommer les sucres libérés de la mucine intestinale afin de croître rapidement et d'être compétitifs face aux bactéries commensales [5]. De plus, les substrats de la néoglucogenèse semblent importants pour le maintien des EHEC O157:H7 dans le contenu intestinal bovin [6]. De façon similaire, plusieurs sucres dérivés de la mucine sont consommés par les EHEC O157:H7 colonisant le tractus intestinal de souris traitées à la streptomycine, et des substrats non-identifiés de la néoglucogenèse sont importants durant la compétition avec les *E. coli* commensales [7,8]. L'adaptation métabolique des EHEC O157:H7 au microbiote intestinal demeure méconnue et nécessite d'être étudiée afin de mettre en évidence les voies métaboliques utilisées par le pathogène en réponse à l'activité métabolique du microbiote. La régulation des gènes de virulence des EHEC est complexe et dépend de la présence de composés issus de l'hôte et du microbiote intestinal [9]. Même si plusieurs liens ont été établis entre la présence de certains composés intestinaux et la régulation des gènes de virulence des EHEC, peu d'informations sont disponibles sur l'influence du microbiote intestinal et de son activité métabolique sur la régulation des gènes de virulence des EHEC O157:H7. Des études doivent être menées dans ce domaine afin de mieux comprendre et prévenir les infections aux EHEC.

Section II- Revue de littérature

1. Les EHEC O157:H7

1.1. Les EHEC et autres *E. coli* pathogènes intestinaux

Bien que des souches d'*E. coli* interagissent de façon commensale chez l'humain, plusieurs souches virulentes existent et représentent une menace pour la santé humaine. Responsables de maladies parfois mortelles chez l'homme, plusieurs souches virulentes d'*E. coli* sont considérées aujourd'hui comme un problème majeur de santé publique. Au cours de l'évolution, l'acquisition de nouveaux déterminants génétiques a permis l'apparition et la diversification de souches pathogènes d'*E. coli* capables de coloniser de nouvelles niches écologiques, tel l'épithélium intestinal. Ces souches pathogènes sont classées en pathovars, selon la symptomatologie, le tropisme tissulaire et selon l'aspect phénotypique et moléculaire de l'interaction de la bactérie avec les cellules de l'hôte. Sept pathovars majeurs ont été identifiés comme responsables de maladies intestinales chez l'homme, les *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC), les *E. coli* enterohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC), les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), les *E. coli* adhérentes invasives (AIEC) et les *E. coli* entéroinvasives (EIEC /*Shigella*) [10] (Figure 1).

EPEC

Les *E. coli* entéro-pathogéniques adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle, effacent les microvillosités et forment des lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) en provoquant le réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte. Ce processus déclenche une réponse inflammatoire et la diarrhée. La production du pilus Bfp (bundle-forming pili) confère aux EPEC la capacité à former des microcolonies.

EHEC

Les *E. coli* enterohémorragiques produisant le SST3, forment également des lésions A/E, mais localisées au niveau des entérocytes du colon. Les EHEC possèdent la caractéristique de produire la Shiga toxine (Stx). Stx est absorbée de façon systémique et est responsable du développement du SHU.

EAEC

Les *E. coli* entéroaggrégatifs forment des biofilms au niveau de la muqueuse intestinale. Les bactéries adhèrent entre elles et à la surface de la cellule hôte formant un amas d'adhérence agrégatif. Les EAEC sont responsables de diarrhées chroniques.

ETEC

Les *E. coli* entérotoxigéniques adhèrent aux entérocytes en utilisant des facteurs de colonisation (CF) et induisent des diarrhées aqueuses par la production d'entérotoxines thermolabiles ou thermostables.

DAEC

Les *E. coli* à adhérence diffuse sont dispersés sur la surface des entérocytes, résultant en une adhérence diffuse. Les DAEC induisent une exacerbation de certaines microvillosités qui vont envelopper les bactéries.

AIEC

Les *E. coli* adhérentes invasives colonisent la muqueuse intestinale des patients atteints de la maladie de Crohn et sont capables d'envahir les cellules épithéliales et de se répliquer dans les macrophages. Les AIEC utilisent le fimbriae de type I pour adhérer aux cellules de l'hôte et le fimbriae LPF (Long Polar Fimbriae) pour l'invasion cellulaire.

EIEC

Les *E. coli* entéroinvasives sont des pathogènes intracellulaires qui accèdent à la sous-muqueuse intestinale en transitant au travers des cellules M dans le colon. Les EIEC gagnent les macrophages de la sous-muqueuse, s'y échappent en provoquant leur mort et envahissent les colonocytes au sein desquels le pathogène peut se mouvoir à l'aide de microfilaments d'actine. Les EIEC se déplacent ensuite latéralement au sein de l'épithélium en franchissant les membranes plasmidiques basolatérales.

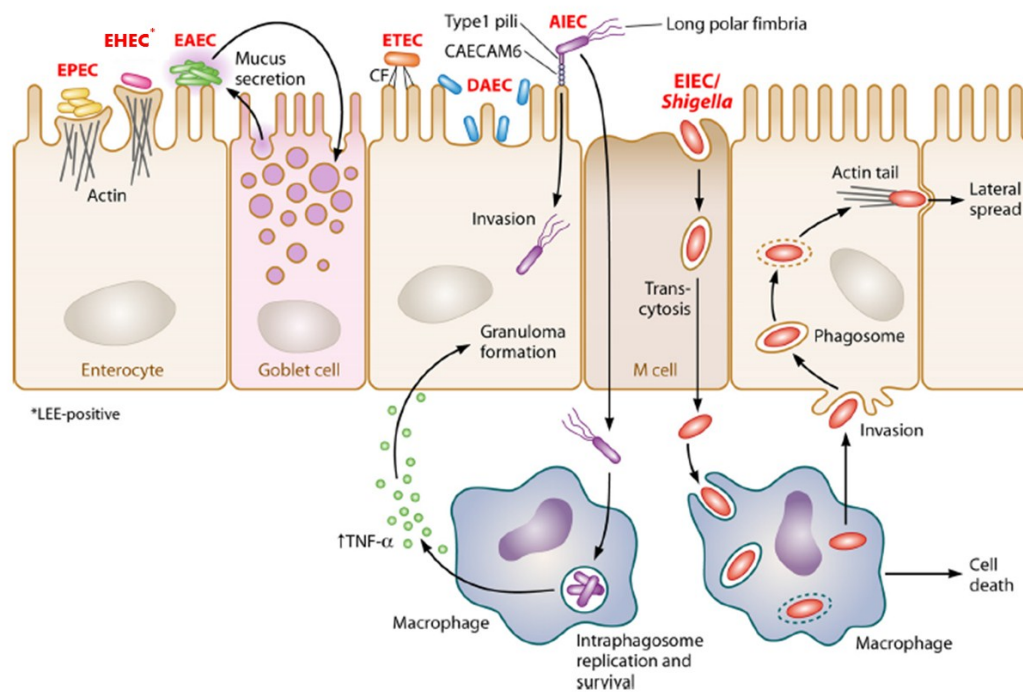


Figure 1. Schémas des stratégies d'adhérence à l'épithélium intestinal des différents pathovars d'*E. coli* pathogènes entériques. Selon Croxen et al. [10]. Les différents types d'*E. coli* pathogènes possèdent leur propre mécanisme d'adhérence aux cellules épithéliales intestinales. Les EPEC (jaune) et les EHEC (rose) qui possèdent le LEE adhèrent de façon intime aux cellules épithéliales en formant une structure en piédestal, les EAEC (vert) agrègent et forment un biofilm, les ETEC (orange) en utilisant des facteurs de colonisation, les DAEC (bleue) sont capables d'adhérence diffuse, les AIEC (violet) adhèrent aux cellules épithéliales et sont capables d'envahir les macrophages et les EIEC (*Shigella*) (rouge) envahissent les colonocytes et les macrophages.

Les EHEC sont des *E. coli* producteurs de Stx (STEC) et sont responsables de colites hémorragiques pouvant mener au SHU ou au syndrome purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), ces derniers étant liés à la production de Stx. La dénomination EHEC correspond aux STEC isolés de cas cliniques [11]. Il est important de noter que les souches EHEC ne produisent pas toutes le SST3 responsable des lésions A/E. En effet, certaines souches EHEC provoquent le SHU sans induire de lésions A/E. Pour exemple, l'épidémie d'EHEC apparue au mois de mai 2011 en Allemagne a été causée par une souche de sérotype O104:H4 qui ne produit pas le SST3 et dont le profil génétique correspond à une EAEC [12]. De façon similaire, toutes les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme.

1.2. Le sérotype O157:H7

Les sérotypes d'EHEC sont définis par la combinaison O:H de leurs antigènes lipopolysaccharidiques de surface (O), et flagellaires (H). Plus de 100 sérotypes d'EHEC ont été isolés de cas cliniques humains [13]. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment isolé de cas cliniques et le plus souvent impliqué dans des cas de SHU au niveau mondial. Ainsi, dans les analyses épidémiologiques, sont distingués les EHEC de sérotype O157 et ceux des sérotypes non-O157. Parmi les EHEC non-O157 plusieurs se distinguent par leur prévalence dans les cas d'infection. Au niveau mondial, les sérotypes O26, O91, O103, O111, O113, O121 et O145 sont reconnus comme dangereux et souvent impliqués dans des épidémies d'origine alimentaire (Tableau I) [13,14]. Un classement des sérotypes de STEC en sérotypes a été proposé et se base sur la sévérité de la maladie et l'incidence du SHU et de la colite hémorragique (Tableau II) [15].

Pays	STEC de sérotype non-O157 identifiés	% de patients infectés par les STEC non-O157/ patients infectés par STEC	Cas d'infection à STEC non-O157/ Cas d'infection à STEC
United States	O26, O45, O103, O104, O111, O119, O121, O145, OR	44	62/141
Canada	O2, O26, O91, O103, O111, O113, O145	20	69/341
United Kingdom	O26, O55, O145	28	15/53
Germany	O26, O55, O76, O91, O103, O111, O113, O118, O128, O145, O146, ONT, OR	44	327/748
Spain	O26, O98, O118, O145, O150	78	87/111
Italy	O26, O55, O103, O111, O145	34	92/264
Czech Republic	O1, O5, O26, O55, O111	57	16/28
Belgium	O26, O91, O111, O113, O118, OR, ONT	63	41/65
France	O91, O103, O113, OX3	33	39/118
Denmark	O26, O103, O111, O117, O121, O128, O145, O146, O174, OR	75	493/655
Finland	OR, O15, O26, O103, O145, O174	53	57/107
Sweden	O8, O117, O121, OR, ON	33	20/60
Australia	O6, O26, O48, O98, O111	69	31/45
New Zealand	O22, O26, ONT, OR	100	16/16
Chile	O26, O111	63	5/8
Argentina	O8, O26, O103, O113, O121, O145, O174, ONT	40	38/96
Japan	O26, O111, O128, O145, O165	19	10/52

Tableau I. Identification des sérotypes de STEC non-O157 impliqués dans des infections humaines dans 17 pays industrialisés entre 1982 et 2003. Selon Johnson *et al.* [13]. Les sérotypes O26, O91, O103, O111, O113, O121 et O145 sont, après les EHEC O157, les plus souvent isolés de cas cliniques à l'échelle mondiale.

Sérotypotype	Incidence relative	Fréquence d'implication dans les épidémies	Association avec des maladies sévères ^a	Sérotypes
A	Élevée	Commun	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	non commun	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21 autres...
D	Faible	Rare	Non	Multiple
E	Non-humain seulement	NA ^b	NA	Multiple

^a SHU ou colite hémorragique

^b NA, non applicable

Tableau 2. Classification des STEC en sérotypes. Selon Karmali *et al.* [15]. Les sérotypes sont classés en fonction de la sévérité de la maladie et l'incidence du SHU et de la colite hémorragique. Le sérotypotype A (EHEC

O157) regroupe les EHEC communément impliqués dans les épidémies et responsables des symptômes les plus graves de la maladie. Le sérotypage B regroupe les sérotypes impliqués de façon moyennement fréquente dans les épidémies et sont associés comme les EHEC O157 à la colite hémorragique et au SHU. Le sérotypage C contient les souches rarement isolées de cas cliniques mais sont associées à la maladie sévère. Les sérotypes classés dans le sérotypage D ne sont pas associés à la maladie chez l'humain et le sérotypage E contient les STEC qui ne sont pas isolés de l'humain.

Le sérotype O157:H7 fut soupçonné d'être la cause d'une diarrhée sanglante chez un patient en 1975 et fut identifié comme la cause d'une épidémie causée par la consommation de bœuf haché en 1982 [16,17]. En 2006, au Canada, il a été estimé que les sérogroupes O157 et les non-O157 furent responsables, respectivement, d'environ 12 800 et 20 500 cas de maladie [18].

Le sérotype O157:H7 aurait émergé il y a plusieurs centaines voire plusieurs milliers d'années [19]. L'hypothèse retenue à ce jour est qu'une souche EPEC de sérotype O55:H7 aurait mené à l'apparition des EHEC O157:H7 via, entre autres, l'acquisition des gènes codant pour Stx [20,21].

1.3. Réservoir et vecteur de transmission

Les bovins sont porteurs asymptomatiques et le réservoir principal d'EHEC O157:H7. D'après plusieurs rapports, la muqueuse recto-anale bovine est considérée comme le site de colonisation préférentiel des EHEC de sérotype O157:H7 [22]. Cependant, cette observation réalisée initialement chez des animaux artificiellement colonisés par le pathogène est parfois remise en question. Dans l'étude menée par Keen *et al.* [23], plusieurs bovins sécrétant naturellement des EHEC de sérotype O157 montrent une nette répartition du pathogène tout au long du tractus intestinal. Ceci indique que les EHEC sont plus largement adaptés au tractus intestinal bovin. Les EHEC O157:H7 ont été isolés de plusieurs autres animaux considérés comme des réservoirs secondaires tels le porc, le

mouton, le cerf, le sanglier, le lapin, les oiseaux, le chien, les rongeurs ou bien encore les insectes [24].

La prévalence estimée du portage d'EHEC O157:H7 par les bovins varie beaucoup d'une étude à l'autre. Les raisons de cela sont multiples et impliquent des différences dans les techniques d'échantillonnage et de détection des EHEC, ainsi que la variabilité temporelle du portage bovin. Un rapport, compilant les analyses de la prévalence des STEC chez les bovins obtenues sur 3 décennies, indique que le taux de prévalence d'EHEC O157 se situe entre 0.3 et 19.7 % chez les bovins d'engraissement, entre 0.7 et 27.3 % chez les bovins issus de pâtures irriguées et entre 0.9 et 6.9 % chez les bovins élevés en prairie (« rangeland forages ») [25]. Le portage bovin suit un rythme saisonnier avec un taux de prévalence plus élevé pendant l'été [26] et ceci corrèle avec des contaminations humaines plus fréquentes en cette période. La quantité d'EHEC O157:H7 sécrétée dans les fèces bovines peut atteindre 10^5 UFC/g de fèces [27]. Les animaux excréant transitoirement de fortes quantités d'EHEC sont appelés des « super-excréteurs » [28].

Plusieurs facteurs tels que l'âge et le sexe sembleraient influencer le portage bovin. Les jeunes animaux non-sevrés sont rarement porteurs de STEC alors que les jeunes animaux sevrés sont davantage porteurs que les animaux âgés [27,29-31]. De plus, les génisses sécrèteraient davantage de STEC par rapport aux veaux [32]. L'alimentation influencerait également le portage des STEC. La prévalence des STEC chez les bovins nourris avec les fourrages est généralement plus importante [33,34].

Les voies de contamination aux EHEC O157:H7 sont diverses (Figure 2). La consommation d'aliments contaminés d'origine bovine est la source majeure de transmission du pathogène à l'humain. Parmi ces aliments, la viande de bœuf mal cuite est souvent incriminée dans les cas d'infections. Effectivement, dans les usines d'abattage la viande peut être souillée par contact avec les intestins de l'animal lors de l'éviscération, ou bien par contact avec la peau de l'animal qui est souvent porteuse du pathogène. La consommation de produits laitiers non-

pasteurisés, tel que le lait et les fromages, est une cause importante d'infection. À la base du problème, le lait peut être contaminé par le biais des mamelles de vaches porteuses d'EHEC. Les légumes et les fruits sont également souvent incriminés dans les cas d'infection. La contamination de ces derniers peut se faire via l'épandage de fumier ou bien l'arrosage avec de l'eau souillée par de la matière fécale bovine. L'excrétion des EHEC dans l'environnement peut conduire à la contamination de l'eau, potable ou de baignade, qui devient une source d'infection. Des contaminations humaines surviennent également dans les fermes d'élevage par contact direct avec les bovins ou bien avec les matières fécales. Finalement, les contaminations interhumaines sont rapportées lors d'épidémies, en particulier dans les hôpitaux et les crèches.

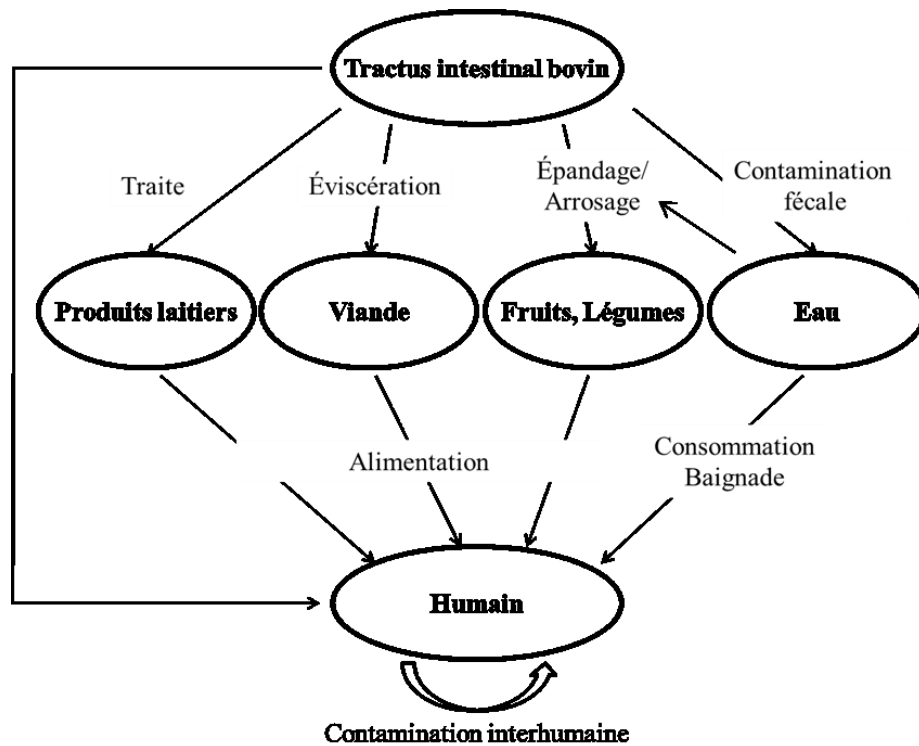


Figure 2. Réservoir et modes de transmission des EHEC à l'humain. Le tractus intestinal bovin est la source primaire de contaminations humaines. Les produits laitiers, la viande de bœuf, les fruits et légumes et l'eau de boisson ou de baignade peuvent être contaminés par les EHEC et devenir des vecteurs de transmission du pathogène à l'humain. Les contaminations directes par contact avec les bovins ne sont pas rares et les contaminations interhumaines peuvent survenir lors d'épidémies.

1.4. Symptomatologie

Plusieurs études épidémiologiques mettent en évidence la faible dose infectieuse des EHEC et indiquent que l'ingestion de moins de 50 cellules bactériennes peut causer la maladie [35,36]. Généralement, la période d'incubation avant l'apparition des premiers symptômes est de 3 jours pour les EHEC O157:H7 (Figure 3) [37]. Une infection à EHEC peut causer de nombreux symptômes tels des crampes abdominales, des vomissements, la diarrhée généralement sanglante et le SHU. Habituellement, les premiers symptômes apparents sont les crampes

abdominales et les vomissements qui sont suivis de la diarrhée qui devient sanglante dans plus de 80% des cas d'infection à EHEC O157:H7 (Figure 3) [38,39]. Les diarrhées provoquées par EHEC O157:H7 se résolvent généralement en une semaine chez les personnes les moins sensibles. Cependant, les infections à EHEC demeurent un problème majeur du fait du risque de développement du SHU. Le SHU peut se développer entre 5 et 13 jours après l'apparition des premières diarrhées et implique une thrombocytopénie, une anémie hémolytique et une insuffisance rénale aigue [38]. Une étude épidémiologique menée sur 20 ans aux États-Unis montre que le SHU causé par EHEC O157:H7 se développe dans 4% des cas et que son taux de mortalité est de 0.5% (Figure 3) [40]. Il est cependant observé que les enfants de moins de 10 ans sont plus susceptibles au SHU avec 14% de risque de développer le syndrome et un taux de mortalité situé entre 1 et 4% [41,42]. Il est à noter que durant l'épidémie d'EHEC O104:H4 en Allemagne, le taux SHU a atteint au total 20% des cas [43]. Les séquelles liées au SHU concernent entre 20 et 40 % des patients et peuvent impliquer des complications cardiaques ou gastro-intestinales, des désordres neurologiques, de l'hypertension et des maladies rénales chroniques [42]. Outre le SHU, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) peut être engendré par une infection à EHEC. Le PTT présente les mêmes caractéristiques physiopathologiques que le SHU mais en diffère par le fait que les patients présentent une fièvre importante et des symptômes neurologiques plus marqués. Le PTT touche plus particulièrement les personnes âgées.

Symptomatologie d'une infection à EHEC O157:H7

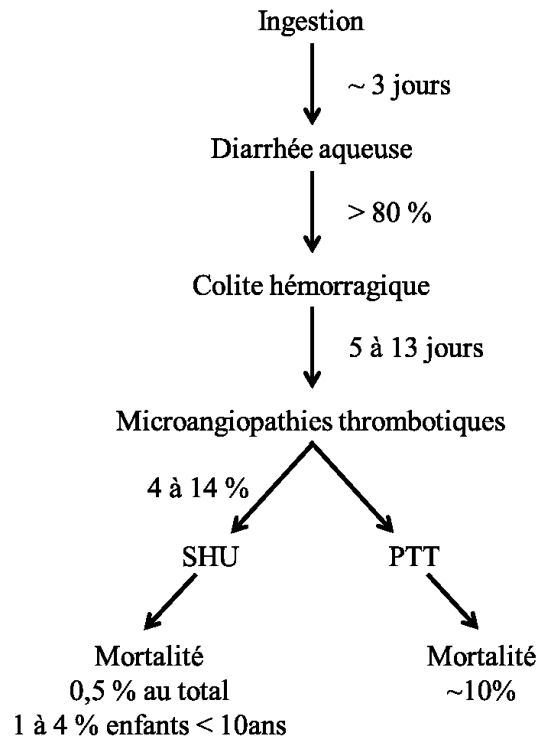


Figure 3. Évolution clinique d'une infection à EHEC O157:H7. Le temps moyen d'incubation est de 3 jours et les premiers symptômes sont les crampes abdominales et la diarrhée. Cette dernière devient sanglante dans 80 % des cas en moyenne. Les personnes les plus susceptibles développent des microangiopathies thrombotiques telles que le SHU et le PTT. Le SHU est contracté par 14 % des enfants en bas âge et est mortel dans 1 à 4 % des cas pour cette même tranche de population. Le PTT affecte davantage les personnes âgées et est mortel dans 10 % des cas en moyenne.

1.5. Épidémies de grande ampleur

Les pays développés sont plus concernés par les épidémies causées par les EHEC. Parmi les plus importantes, l'épidémie de 1993 à Washington aux États-Unis a causé 144 cas d'hospitalisation parmi les 477 individus infectés et diagnostiqués, 30 cas de SHU et 3 décès. La moyenne d'âge des patients était de 7.5 ans (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00020219.htm>). Cette

épidémie fût associée à la consommation de viande de bœuf hachée servie en restauration rapide. En 1996, dans la ville de Sakai au Japon, apparaît une épidémie d'EHEC O157:H7 liée à la consommation de pousses de radis [44]. Cette épidémie causa 9 451 cas d'infection dont 101 SHU et 12 décès. La souche responsable de cette épidémie est dénommée Sakai et est aujourd'hui une souche de référence pour l'étude des EHEC O157:H7. Au Canada, dans la communauté de Walkerton (Ontario) peuplée de 5 000 habitants en l'an 2000, plus de 2 300 personnes tombent malades suite à la consommation d'eau de consommation contaminée [45]. Parmi celles-ci, 27 ont développé le SHU et 7 sont décédées. En 2011, l'Allemagne connaît la plus grande épidémie à EHEC jamais observée en Europe avec plus de 4000 personnes infectées, 850 cas de SHU et 51 décès. La consommation de fenugrec contaminé serait la cause de cette épidémie. Cette épidémie n'était pas liée à une EHEC O157:H7 mais à une EHEC de sérotype O104:H4 dont le profil génétique correspond à une EAEC [12].

1.6. Traitements

Les personnes adultes en santé sont généralement moins sensibles à une infection à EHEC O157:H7 et, étant atteintes uniquement de diarrhée, ne requièrent pas de traitements particuliers. L'antibiothérapie, communément utilisée pour traiter les infections bactériennes, est susceptible d'augmenter le risque de développement du SHU dans le cas des infections à EHEC et est par conséquent fortement controversée [46,47]. En effet, certains antibiotiques augmentent, *in vitro*, la relâche de Stx par le pathogène en stimulant l'entrée en phase lytique du bactériophage portant les gènes codant pour Stx [48,49]. Actuellement, il n'existe aucun traitement pour éviter le développement du SHU auquel les enfants en bas âge et les personnes âgées ou immunodéprimées sont plus sensibles. Lors du développement du SHU, des traitements mis en place contribuent à atténuer les symptômes, tels la diurèse, l'hémodialyse ou bien encore

le transfert de plasma. Ces traitements permettent de diminuer de façon considérable le taux de mortalité.

Des stratégies thérapeutiques diverses font l'objet d'études. Lors de l'épidémie causée par EHEC O104:H4, l'administration de l'anticorps, Eculizumab, utilisé pour bloquer la cascade l'activation du complément dans le cas du SHU atypique, a permis la guérison de plusieurs patients atteints du SHU post-infectieux [50]. D'autres approches, telle l'utilisation d'anticorps anti-Stx, montrent des résultats intéressants. Dans un modèle murin, l'administration intraveineuse d'un anticorps monoclonal humanisé anti-Stx diminue la mortalité de l'animal suite à une infection à STEC [51]. De même, chez le porc gnotobiotique, il a été montré que l'administration post-infection d'un anticorps anti-Stx humanisé diminue l'apparition de symptômes neurologiques ainsi que la mortalité [52]. L'utilisation de ligands mimant le récepteur à Stx et visant à diminuer la dissémination de Stx est une approche qui, chez des patients atteints du SHU, n'est pour le moment pas concluante [53]. Cependant, l'utilisation de bactéries recombinantes exprimant à leur surface des analogues structuraux du récepteur de Stx a fait ses preuves dans un modèle murin, en abolissant la létalité liée à une infection à EHEC O157:H7 [54].

Clairement, des travaux sont nécessaires afin de trouver des moyens alternatifs de prévenir le développement du SHU ou bien les infections à EHEC.

2. Les facteurs de virulence

Les EHEC possèdent de nombreux facteurs de virulence codés par des îlots de pathogénicité acquis horizontalement au cours de l'évolution. Ces derniers ont permis aux EHEC de coloniser de nouvelles niches écologiques tel l'épithélium intestinal mammifère [55]. Les facteurs de virulence les plus caractérisés sont le SST3 et les effecteurs sécrétés ainsi que la Shiga toxine qui est associée au SHU.

Cependant, de nombreux autres facteurs sont suspectés jouer un rôle dans la pathogénèse des EHEC.

2.1. Les facteurs d'adhésion

2.1.1. Le SST3

Le SST3 est un système de sécrétion de type 3 utilisé par plusieurs bactéries pathogènes à Gram-négatif infectant les plantes, les insectes et les animaux à sang chaud incluant l'humain. De nombreux pathogènes humains produisent un SST3 tels que les EHEC, les EPEC, *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia* qui sont des pathogènes intestinaux; *Bordetella*, responsable de la coqueluche; *Pseudomonas aeruginosa*, causant des infections pulmonaires et urinaires, des septicémies et des endocardites; *Chlamydia trachomatis* qui est sexuellement transmissible; et *Buckholderia pseudomallei* causant des bactériémies et des pneumonies [56].

2.1.1.1. Les lésions attachantes et effaçantes

Plusieurs facteurs d'adhésion ont été mis en évidence chez les EHEC mais le rôle du SST3 dans la maladie humaine reste le mieux établi. Les EPEC et la majorité des EHEC produisent le SST3. Ce dernier est responsable de la formation de lésions A/E à la surface des entérocytes du colon humain, pour ce qui est des EHEC (Figure 4). Ces lésions sont caractérisées par l'effacement des microvillosités à la surface des entérocytes, une adhérence intime du pathogène aux entérocytes et la formation d'un piédestal sur lequel culmine la bactérie [55]. La formation du piédestal est causée par un réarrangement du cytosquelette des cellules de l'hôte, médié par la polymérisation de l'actine [55].

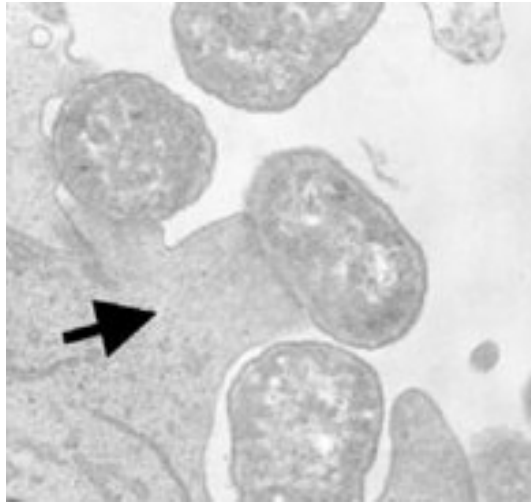


Figure 4. Lésion A/E. Selon Carvalho *et al.* [57]. Lésion A/E telle qu'indiquée par une flèche et formée par la souche EHEC 86-24 de sérotype O157:H7 sur les cellules HCT-8 (cellule épithéliale du colon humain).

2.1.1.2. Structure

Le SST3 est une seringue moléculaire dont la fonction principale est d'injecter dans les cellules de l'hôte des protéines effectrices [58]. Tel qu'indiqué dans la Figure 5, le SST3 se compose d'un anneau basal situé dans la membrane interne de la bactérie, de la protéine périplasmique EscJ, d'un anneau situé dans la membrane externe, d'un translocon et à son extrémité, les effecteurs EspB et EspD qui forment un pore dans la membrane de la cellule hôte [58]. Les protéines EscD (Pas), EscQ, EscR, EscS, EscT, EscU et EscV forment l'anneau de la membrane interne, ce dernier étant associé à la protéine EscN, une ATPase dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la translocation des protéines effectrices [59,60]. SepL et SepD sont des composantes cytoplasmiques supplémentaires du SST3 et qui seraient importantes pour la formation du système de sécrétion et la translocation des effecteurs [61]. La protéine périplasmique EscJ servirait de jonction entre l'anneau de la membrane interne et celui de la membrane externe

constitué de la protéine EscC [60,62-64]. À la base du translocon, la protéine EscF est ancrée sur EscC et forme la structure de la seringue à partir de laquelle EspA polymérise pour former un long filament creux [65-69]. La formation du translocon se termine par l'association des protéines EspB et EspD à l'extrémité du système de sécrétion pour former un pore de translocation [70]. L'extension filamenteuse du SST3 liée à la polymérisation de EspA à partir de EscF, est une caractéristique du SST3 des EHEC et des EPEC. Le schéma du SST3 est présenté dans la Figure 5 ci-dessous.

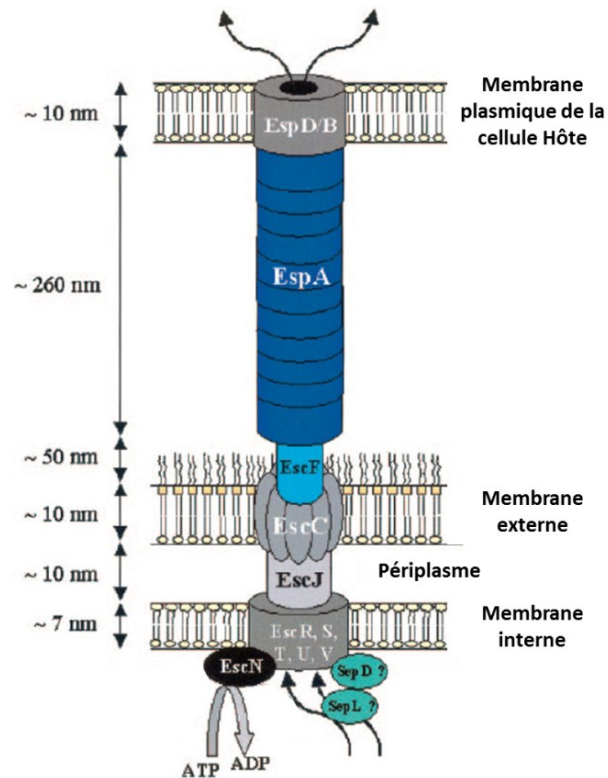


Figure 5. Schéma du système de sécrétion de type III. Selon Garmendia *et al.* [58].

2.1.1.3. Les effecteurs

Les effecteurs sécrétés par le SST3 sont directement impliqués dans les lésions A/E en induisant une liaison intime entre le pathogène et la cellule hôte et en déclenchant le réarrangement du cytosquelette des entérocytes. En plus de déclencher les lésions A/E, les effecteurs endommagent l'épithélium intestinal en fragilisant les jonctions serrées, en endommageant les mitochondries, en induisant l'apoptose des entérocytes et en influençant la réponse immunitaire. De nombreux effecteurs sont sécrétés par le SST3 et ces derniers peuvent être multifonctionnels et avoir des fonctions redondantes (Figure 6).

Liaison intime

L'effecteur Tir est responsable de la liaison intime des EHEC et des EPEC avec les entérocytes. Tir est une protéine de 78 kDa qui, une fois sécrétée, se place dans la membrane de la cellule hôte et sert de récepteur pour le pathogène. Tir se lie à la protéine Eae (*E. coli* attaching and effacing), l'intimine, insérée dans la membrane externe de la bactérie. Eae est une protéine de 94 kDa qui n'est pas sécrétée par le SST3.

Réarrangement du cytosquelette

Les effecteurs Tir, EspFu, Map, EspH, EspF et EspG ont un rôle dans le réarrangement du cytosquelette. La protéine Tir déclenche le recrutement de l'actine dans la cellule hôte menant à la formation des lésions A/E. Chez les EHEC, contrairement aux EPEC, l'effecteur Tir ne possède pas la capacité de recruter le facteur Nck de l'hôte requis pour initier le recrutement de l'actine. Effectivement, chez les EPEC, Tir est phosphorylé au niveau de la tyrosine Y454 et permet un recrutement direct du facteur Nck. Chez les EHEC, Tir ne possède pas Y454. En revanche, les EHEC sécrètent un effecteur supplémentaire, EspFu (TccP) qui joue le rôle d'intermédiaire entre Tir et Nck. L'effecteur Map est responsable de la formation transitoire de filopodes au niveau du site d'infection

bactérienne [71]. EspH module la structure du cytosquelette de la cellule hôte et affecte la formation du piédestal [72]. Plus récemment, il a été montré que EspH est capable d'interagir directement avec Tir pour recruter l'actine sans faire intervenir le facteur Nck [73]. EspF est l'effecteur ayant le plus de fonctions caractérisées dont celle d'influencer le démantèlement des filaments intermédiaires du cytosquelette [74]. L'effecteur EspG est identifié comme une protéine capable de déclencher la formation de fibres d'actine et de détruire les microtubules [75,76].

Destruction de la barrière épithéliale

Les effecteurs EspF et Map sont impliqués dans la destruction de la barrière intestinale indépendamment d'un de l'autre. EspF est impliqué dans la redistribution des occludines au niveau des jonctions serrées [77] et Map est essentiel pour altérer ces jonctions serrées [78].

Cytotoxicité

EspF s'est fait attribuer une troisième fonction en étant impliqué dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale, dans la relâche du cytochrome c et dans le déclenchement de l'apoptose cellulaire [79-81].

Modulation de la réponse immunitaire

Il a été montré que les effecteurs NleC et NleE agissent en coopération pour diminuer la réaction inflammatoire causé par EHEC ou EPEC en inactivant la voie NK- κ B responsable du déclenchement de l'immunité innée [82]. NleC est une protéase à zinc que clive la sous unité p65 de NK- κ B [82]. De façon similaire, il a été suggéré que NleHI perturbe le déclenchement de l'immunité innée de l'hôte en se liant à une sous unité du NK- κ B [83,84]. Récemment, un autre effecteur, NleB, a été montré comme capable d'inactiver la voie NK- κ B. NleB possède une activité N-acetyl-D-glucosamine transférase qui modifie l'activité d'une enzyme impliquée dans l'activation de la voie NK- κ B [85]. L'ensemble de ces résultats

indique que l'atténuation de la réponse inflammatoire semble être un processus important pour les EHEC et les EPEC lors de l'infection.

D'autres effecteurs ont été identifiés. EspJ inhibe l'opsono-phagocytose induite par les macrophages [86] et NleA inhibe l'export protéique COP-II dépendent au niveau du réticulum endoplasmique des cellules [87]. De nombreux autres effecteurs sont sécrétés par le SST3 et leur rôle dans les infections à EHEC et EPEC reste à élucider [88].

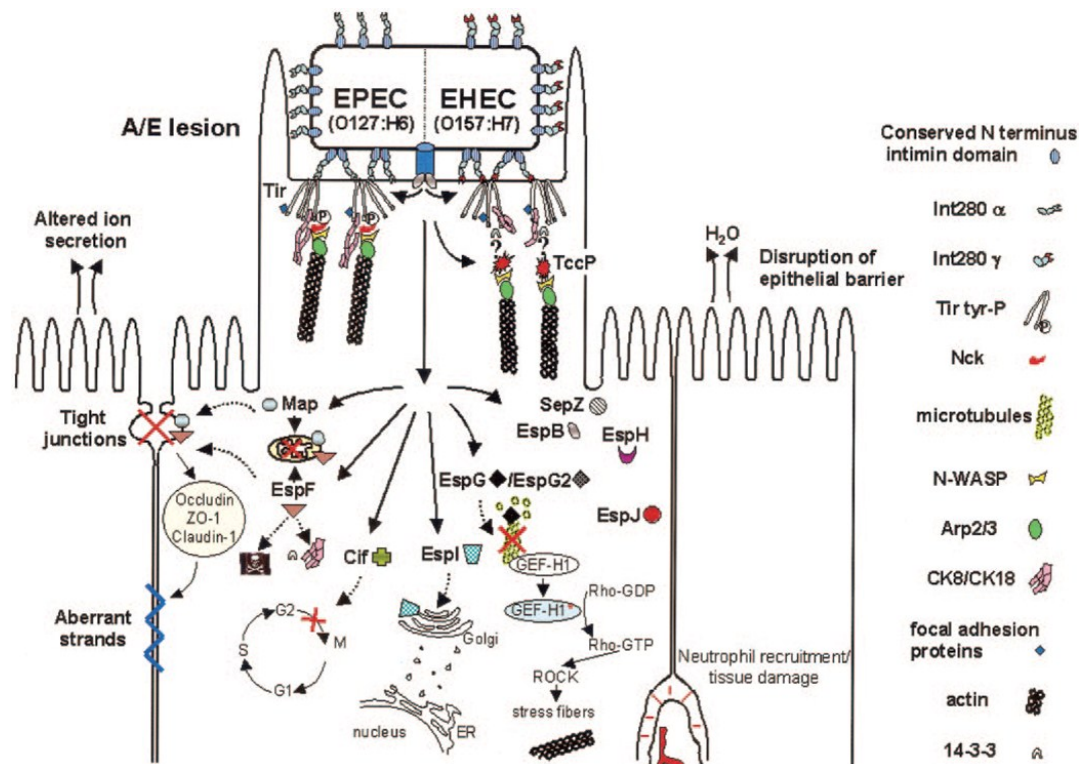


Figure 6. Sécrétion par le SST3 des effecteurs au sein de la cellule hôte. Selon Garmendia *et al.* [58]. Sur ce schéma sont indiqués les effecteurs impliqués dans la liaison intime (Tir), dans le réarrangement du cytosquelette (Tir, TccP/EspFu, Map, EspH, EspF EspG) et dans la cytotoxicité (EspF).

2.1.1.4. Le locus d'effacement des entérocytes

L'expression des gènes requis pour la synthèse du SST3 sont rassemblés sur un locus génétique appelé le locus d'effacement des entérocytes (LEE) [58,89]. Le LEE est un îlot de pathogénicité chromosomique acquis de façon horizontale par *E. coli*, d'une taille de 43.36 kb et qui code pour les constituants du SST3, des effecteurs, l'intimine, des protéines chaperonnes et des régulateurs (Figure 7). Le LEE ne code pas pour la totalité des effecteurs sécrétés par le SST3. Effectivement, une grande quantité de ceux-ci est codée par des gènes présents sur des bactériophages, souvent non-fonctionnels et intégrés dans le chromosome des EHEC, et sont dénommés Nle pour « non-LEE encoded effectors » [88].

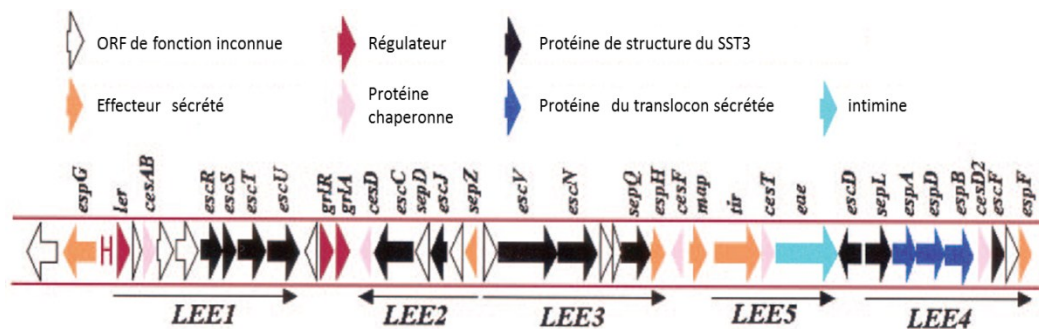


Figure 7. Organisation génétique du LEE. Selon Garmendia *et al.* [58]. Le LEE est constitué de 5 opérons majeurs (LEE1 à LEE5). Le premier gène du LEE1, *ler*, code pour le l'activateur transcriptionnel de tous les opérons du LEE. Le LEE5 possède la particularité de coder pour les protéines Tir et Eae impliquées dans la liaison intime et le LEE4 code pour les protéines du translocon du SST3 à savoir, EspA, EspD et EspB. Les gènes codant les protéines de structure sont présents sur le LEE1, 2, 3 et 4. Le LEE code également pour des protéines chaperonnes (CesA, CesB, CesD et CesT).

2.1.1.5. Régulation transcriptionnelle

L'expression des gènes du LEE est extrêmement régulée et implique de nombreux régulateurs répondant aux conditions environnementales, au métabolisme de la bactérie et à la présence de certains composés. Il a été proposé que la complexité de la régulation des gènes du LEE reflète la nécessité d'exprimer le SST3 dans les conditions optimales. En effet, le SST3 est une machinerie moléculaire coûteuse à produire, immunogène et qui doit être exprimée au niveau d'une niche écologique particulière du tractus intestinal, chez l'homme du moins. La région promotrice du LEE1 est une séquence clé pour l'expression et la régulation transcriptionnelle des gènes du LEE. Cette région comporte un promoteur proximal (P1) et un promoteur distal (P2) [90,91]. L'influence des différents régulateurs sur la régulation du LEE est résumée dans la Figure 8.

H-NS, un répresseur général

La protéine H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) est un répresseur général de l'expression des éléments génétiques acquis par transfert horizontal chez les Entérobactéries [92]. Il a été suggéré que la répression par H-NS serait un mécanisme de protection pour la bactérie, en permettant une expression contrôlée des nombreux gènes acquis de façon horizontale [92]. H-NS cible des séquences d'ADN possédant une faible teneur en GC qui est une caractéristique des îlots de pathogénicité [92]. Parmi ceux-ci, le LEE est directement réprimé par la protéine H-NS qui se fixe aux promoteurs du LEE1, LEE2 et LEE3 [93]. Le LEE1 est réprimé par HNS à 27 °C et non à 37 °C [93]. Récemment, il a été montré que la protéine H-NST (H-NS tronquée) régule positivement l'expression du LEE au niveau transcriptionnel [94]. Dans cette même étude, il a été suggéré que H-NST pourrait réguler le régulon H-NS.

Ler, l'activateur principal du LEE

Le régulateur Ler (LEE-encoded regulator), codé par le premier gène du LEE1, est l'activateur principal des opérons du LEE et est indispensable pour la formation des lésions A/E [95-98]. La protéine Ler agit en dimère et se fixe sur les promoteurs du LEE. Il a été suggéré que Ler antagonise l'action de la protéine H-NS en délogeant cette dernière de son site de fixation sur l'ADN [99,100]. En effet, Ler présente des similarités de séquence avec H-NS au niveau de la région C-terminale impliquée dans la liaison à l'ADN [98].

En plus de réguler l'expression des opérons majeurs du LEE, Ler régule l'expression d'autres gènes présents sur le locus tels *grlR* et *grlA*, *espG* et *map*. De plus, le régulon de Ler s'étend au-delà du LEE avec la régulation de l'expression de gènes plasmidiques ou présents sur des bactériophages. Ainsi, Ler contrôle l'expression du *stcE* codant une métalloprotéase et présent sur le plasmide pO157 des EHEC de sérotype O157:H7, et les gènes *lfp* codant pour le « long polar fimbriae » [101,102]. La protéine Ler régule également l'expression de son propre gène par un mécanisme d'auto-répression [103]. Les concentrations locales de la protéine Ler au niveau du promoteur LEE1 sont probablement importantes pour la régulation du LEE [103-105]. L'auto-répression de Ler se produirait lorsque la protéine est en trop forte concentration afin d'éviter une production trop importante du SST3. Le régulateur Ler étant l'activateur principal des gènes du LEE, beaucoup de régulateurs affectant leur expression et la formation des lésions A/E agissent directement au niveau de la région promotrice du LEE1.

GrlA et GrlR, deux régulateurs codés par le LEE

GrlA et GrlR sont des protéines codées par l'opéron *grlRA* situé en aval du LEE1 (Figure 7) et correspondent, respectivement, à un activateur et à un répresseur des gènes du LEE [106]. GrlA active directement la transcription de *ler* et crée une boucle de rétroaction positive avec le régulateur Ler. Cette rétroaction positive est freinée par l'auto-répression de Ler [103] et par le régulateur GrlR qui inhibe GrlA par séquestration [107]. Comme GrlA et GrlR sont co-exprimés, le

régulateur GrlA est généralement inhibé s'il n'y a pas de contrôle de GrlR. Cependant, dans certaines conditions, la protéine GrlR serait potentiellement dégradée par le complexe ClpXP, libérant GrlA et permettant l'activation de *ler* [108].

Coordination de la réponse à l'acidité avec l'expression du LEE

Les *E. coli* commensaux et pathogènes ont la capacité à résister à des pH très bas, situés entre 2 à 2.5 [9,109]. Cette résistance à l'acidité expliquerait en partie l'efficacité de la colonisation intestinale des EHEC, reflétée par leur faible dose infectieuse (< 50 bactéries), en particulier lors du passage de la bactérie dans l'estomac où le pH peut varier entre 1.5 et 5. Parmi les quatre mécanismes connus de résistance à l'acidité chez *E. coli*, le système de résistance à l'acidité glutamate-dépendent (système Gad) offre à la bactérie une bonne protection à un pH inférieur à 3. Les protéines GadE et YhiF sont deux protéines du système Gad avec GadE correspondant au régulateur principal de ce système. Il a été montré que GadE et YhiF inhibent le LEE et l'adhérence des EHEC O157:H7 aux cellules intestinales humaines Caco-2 et aux cellules épithéliales d'origine bovines [110,111]. Des régulateurs codés par des bactériophages sont requis pour une inhibition optimale du LEE médiée par GadE et YhiF [111]. Cette même étude montre que GadE interagit avec les promoteurs du LEE1, du LEE2 et du LEE3 [111]. Cependant, les mécanismes de régulation du LEE par GadE et YhiF ne sont pas encore précisément décrits.

Dans une autre étude, un régulateur du quorum sensing coordonne l'expression des gènes du LEE avec ceux du système Gad en réponse à la présence d'acyl homoserine lactones (AHLs) présents dans le rumen bovin [112,113]. Les *E. coli* ne possèdent pas d'homologue à LuxI, protéine nécessaire à la production des AHLs mais possède un homologue à LuxR, le senseur des AHLs/régulateur transcriptionnel. Ce régulateur, SdiA détecte les AHLs produits par le microbiote et contrôle directement l'expression des gènes du LEE et indirectement l'expression des gènes du système Gad en réponse aux AHLs. Ceci permettrait aux

EHEC O157:H7 de se préparer à un pH acide et de ne pas exprimer le T3SS dans des conditions défavorables.

Ces données mettent en évidence l'importance pour les EHEC d'adapter le niveau d'expression des gènes du LEE en réponse à l'acidité environnementale.

Coordination du métabolisme avec l'expression du LEE

Les gènes du LEE sont activés par la présence de l'éthanolamine, un sous-produit du catabolisme du phosphatidylethanolamine, un lipide membranaire issu des membranes de cellules procaryotes et eucaryotes [114,115]. L'éthanolamine est un composé utilisé comme source d'azote et non de carbone par *E. coli* O157:H7 [116]. EutR est un activateur transcriptionnel qui répond à la présence d'éthanolamine et de la vitamine B12 et qui régule les gènes *eut* chez *E. coli*. Le régulateur EutR, a été identifié comme activateur des gènes du LEE via une interaction direct avec le région promotrice du LEE1, en amont du promoteur distal P2 [115].

Récemment, un nouveau système à deux composants régulateur des gènes du LEE a été identifié. Ce système a été dénommé FusKR avec FusK correspondant au senseur histidine kinase qui répond à la présence de fucose extracellulaire et FusR correspondant à un répresseur transcriptionnel de *ler* et des gènes d'utilisation du fucose (gènes *fus*) [117]. Ce système à deux composants est codé par les gènes z0462 et z0463 présent sur l'îlot de pathogénicité OI-20 qui est présent uniquement chez les souches EHEC O157:H7 et chez les EPEC dérivant du sérotype O55:H7 [117]. Dans cette étude FusR est identifié comme un répresseur transcriptionnel direct de *ler*.

La disponibilité des sources de carbone influence le profile métabolique des bactéries et plus particulièrement l'expression des voies de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Les EHEC O157:H7 ont acquis la capacité à adapter l'expression des gènes du LEE en réponse à ces changements de profils métaboliques. Le mécanisme de régulation implique deux régulateurs transcriptionnels, Cra et KdpE, qui se lient directement sur le promoteur du LEE1

pour activer l'expression de *ler* dans des conditions de néoglucogenèse [118]. Cra est une protéine sensible à la présence des composés intermédiaires de la glycolyse au niveau intracellulaire et KdpE est le régulateur transcriptionnel du système à deux composants KdpDE impliqué dans le transport du potassium [118,119].

La capacité à adapter l'expression des gènes du LEE en réponse à la disponibilité des nutriments semble très évoluée chez les EHEC O157:H7 et pourrait avoir une importance majeure lors de la colonisation intestinale du pathogène.

Rôle des senseurs adrénérgiques

Plusieurs bactéries pathogènes répondent à la présence des hormones de l'hôte telles la noradrénaline (ou norépinéphrine) et l'adrénaline (ou épinéphrine, forme méthylée de la norépinéphrine) pour promouvoir l'expression de leurs gènes de virulence [120]. Chez *E. coli*, deux protéines histidine kinase jouent le rôle de senseur de ces hormones, soit les protéines QseC et QseE. Ces deux protéines appartiennent respectivement aux systèmes à deux composants QseBC et QseEF. QseC répond à la présence de l'adrénaline, de la noradrénaline ainsi que de l'auto-inducteur 3, lui conférant un rôle dans le quorum sensing, et active les gènes du LEE d'une façon indépendante à QseB [121]. En revanche, la transduction de signal induite par QseC et activant le gène *ler* passerait par le régulateur transcriptionnel KdpE, un partenaire secondaire à QseC qui interagit directement avec la région promotrice du LEE1 [118,121]. QseC est responsable de l'activation de l'expression des gènes *qseEF* qui codent pour le second système à deux composants cité plus haut [122]. L'histidine kinase QseE répond à la présence de l'épinéphrine, du phosphate et du sulfate et phosphoryle le régulateur transcriptionnel QseF [123]. QseE est impliqué dans la régulation des gènes du LEE de façon indépendante à QseF, et des gènes codant des effecteurs non codés par le LEE de manière dépendante à QseF [124]. Il a été proposé que QseE inhibe l'expression des gènes du LEE en inactivant l'action du régulateur transcriptionnel RcsB identifié comme un activateur des gènes du LEE [124].

Rôle de l'oxyde nitrique (NO)

Le NO est un agent antibactérien produit par les cellules intestinales lors d'une inflammation et participe à l'élimination de certains pathogènes de l'intestin [125]. Le NO possède une activité anti-proliférative et cytotoxique sur certains agents pathogènes. Cependant, en concentrations physiologiques le NO n'affecte pas la survie d'*E. coli* ni celle de *Citrobacter rodentium*, un pathogène intestinal de souris mimant les infections à EHEC [125,126]. Cette survie des bactéries observée en présence de NO peut s'expliquer par l'acquisition de mécanismes de détection et de résistance au NO.

Des études réalisées par l'équipe de Christine Martin ont montré que la présence de NO endogène aussi bien qu'exogène inhibe l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales. Cette inhibition de l'adhésion s'accompagne de l'activation de l'expression de *gadE* et *gadX* codant pour les activateurs du système Gad de résistance à l'acidité, et des répresseurs de l'expression du LEE [127]. Cette étude de Branchu *et al*, a démontré une cascade de régulation de GadE, GadX et du LEE par le NO, qui fait intervenir le régulateur principal de la réponse au NO chez les *E. coli* : NsrR. Le NO réprime l'expression du LEE et active celle de *gadE* et de *gadX*. NsrR active indirectement l'expression de *gadE* et *gadX* et active l'expression des opérons LEE1, LEE4 et LEE5 en se fixant sur leurs promoteurs respectifs. En présence de NO, NsrR devient inactif. Ainsi, le NO réprime directement l'expression du LEE en supprimant la fixation de NsrR aux promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5, et indirectement en activant l'expression de *gadE* et donc de *gadX*.

Autres régulateurs transcriptionnels

Deux régulateurs transcriptionnels de la famille des régulateurs de type LysR régulent l'expression de *ler*. Le premier, QseA, est un activateur de l'expression de *ler* qui interagit directement avec les deux promoteurs P1 et P2 du LEE1. QseA a été initialement identifié comme un régulateur répondant au système de quorum sensing *luxS*. Le second, QseD, est un répresseur de

l'expression de *ler* qui agirait possiblement en interagissant avec un autre régulateur non-identifié du LEE [128]. L'expression du gène *qseD* est réprimé par le système à deux composants QseBC [128].

Les EHEC O157:H7 possèdent dans leur génome plusieurs gènes homologues au gène *perC* présent chez les EPEC et codant pour un activateur transcriptionnel de *ler* [129,130]. Chez la souche Sakai, on dénombre 5 gènes homologues à *perC*, soit *pchA*, *pchB*, *pchC*, *pchD* et *pchE* alors que chez la souche EDL933 il n'y en aurait que 4 [129]. Chez la souche Sakai, les protéines PchA, PchB et PchC sont des activateurs de l'expression des gènes du LEE avec un effet plus important de PchA et PchB par rapport à PchC. Cependant, il y aurait des différences entre souches de EHEC O157:H7 car chez la souche EDL933, les gènes *pchA* et *pchB* seraient absents [129]. Le régulateur transcriptionnel LrhA serait un activateur de *pchA* et *pchB* et donc un activateur indirect des gènes du LEE [131].

Finalement, d'autres facteurs semblent jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du LEE. La protéine IHF (Integrated Host Factor) est requise pour l'expression des gènes du LEE chez les EHEC et se lie au promoteur de *ler* [132,133]. La protéine IHF est un hétérodimère composé des produits de *ihfA* et *ihfB* et est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la recombinaison site spécifique, la réplication de l'ADN et la régulation positive ou négative de gènes [134,135]. La protéine Hha a été identifiée comme un régulateur négatif de *ler* [136]. Hha est une protéine capable de se complexer avec le répresseur général H-NS [137]. Deux régulateurs codés par les gènes *etrA* et *eivF* présents sur un locus génétique de la souche Sakai codant pour un système de sécrétion de type III non-fonctionnel ont été identifiés comme répresseur transcriptionnels des gènes du LEE [138]. Toujours chez la souche Sakai, un gène présent sur le O-Island 51 codant pour RgdR, correspondant au prophage non-fonctionnel CP-933C, code pour un activateur des gènes du LEE [139]. Enfin, les régulateurs, CI et CII, de la lysogénie du phage BP-933W codant pour la Shiga toxine régulent l'expression de *ler* [140]. Le régulateur CII dont l'expression est influencée par CI, a été identifié comme un répresseur de *ler* [140].

2.1.1.6. Régulation post-transcriptionnelle

La protéine Hfq

Hfq est une protéine chaperonne qui affecte la stabilité des petits ARN et des ARNm. Chez la souche EHEC O157:H7 EDL933, Hfq réprime l'expression de *ler* en affectant négativement la stabilité de l'ARNm *grlRA* en phase exponentielle de croissance [141]. Il a été suggéré qu'un facteur supplémentaire serait requis par Hfq pour diminuer la stabilité de l'ARNm *grlRA* [141]. En phase stationnaire de croissance, Hfq affecte l'expression de *ler* de façon indépendante à GrlR et GrlA [141]. De plus, Hfq aurait la capacité à cibler l'ARNm de *ler* [142]. Cependant, l'effet de la délétion du gène *hfq* chez la souche EHEC 86-24 induit une inhibition de *ler*, indiquant un effet positif de la protéine Hfq sur l'expression du LEE [143]. Les auteurs proposent qu'il existe un effet différent de Hfq en fonction de la souche EHEC concernée.

Les petits ARN

Il a été montré que le petit ARN non codant DsrA active l'expression de *ler*. Cette activation requiert le facteur RpoS [144]. Plus récemment, les deux petits ARN GlmY et GlmZ ont été identifiés comme régulateurs négatifs de la formation du piédestal par les EHEC et régulateurs de la stabilité des ARNm du LEE4 et du LEE5 [145]. GlmY est un ARN stabilisateur de GlmZ dont la fonction est de réguler la stabilité de l'ARNm du gène *glmS* codant une glucosamine-6-phosphate synthase [146]. GlmZ est également requis pour la régulation du LEE4 et du LEE5 au niveau post-transcriptionnel [145]. Le mécanisme par lequel GlmZ régule le LEE4 et le LEE5, n'implique pas de régulation au niveau du RBS ni de recrutement de la nucléase RNase E connue pour réguler la stabilité l'ARNm du LEE4 et par conséquent, demeure inconnu [145]. Cependant, dans cette même

étude il est démontré que GlmZ possède un site de fixation au niveau de l'ARNm du LEE4 favorisant l'hypothèse du recrutement d'une nucléase.

2.1.1.7. Chronologie dans la sécrétion des effecteurs

Un autre niveau de régulation dans la formation des lésions AE existe avec la chronologie de la sécrétion des effecteurs. En se basant sur l'efficacité de la sécrétion des effecteurs chez les EPEC, il a été démontré que la sécrétion suit l'ordre suivant : Tir > EspZ > EspF > EspH > EspG > Map [147,148]. Il a été proposé que la hiérarchie de sécrétion serait basée sur la concentration intracellulaire des effecteurs et de leur affinité avec les protéines chaperonnes [149]. Ainsi, la protéine CesT chaperonne préférentiellement la protéine Tir pour optimiser sa translocation [150]. La hiérarchisation de la sécrétion des effecteurs serait le résultat d'une évolution basée sur les relations synergiques et antagonistes entre les effecteurs [151].

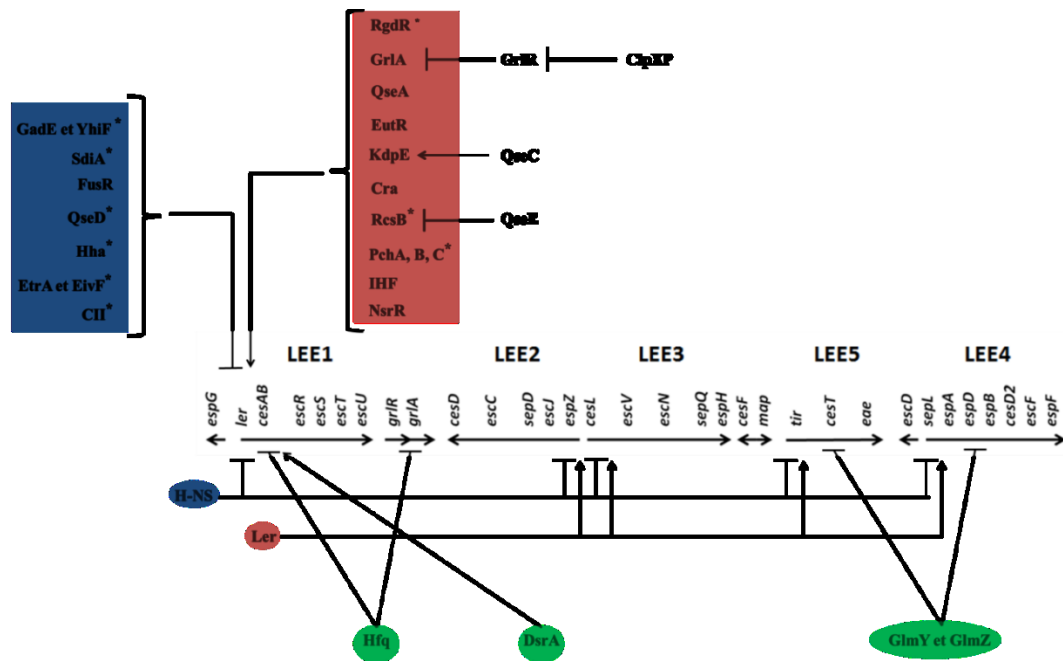


Figure 8. Schéma général de la régulation des gènes du LEE chez les EHEC. De nombreux régulateurs ont été identifiés comme régulateurs des gènes du LEE chez les EHEC. Les activateurs transcriptionnels sont indiqués en rouge, les répresseurs transcriptionnels sont en bleu et les régulateurs post-transcriptionnels sont en vert. La protéine H-NS est un répresseur général des opérons du LEE alors que Ler est l'activateur principal. Les régulateurs indiqués par une étoile (*) sont des régulateurs dont la fixation aux promoteurs du LEE n'est pas démontrée.

2.1.2. Autres facteurs d'adhérence

Plusieurs fimbriae, tels YcbQ et le Lpf (long polar fimbriae) sembleraient jouer un rôle dans l'attachement des EHEC O157:H7 à la matrice extracellulaire des cellules épithéliales et plus particulièrement à la laminine [152,153]. Deux opérons *lfp* ont été identifiés chez les EHEC O157:H7, *lfp1* du OI-141 et *lfp2* du OI-154 [154,155]. Récemment, une autre protéine fimbriaire YadK régulée suite à un stress acide a été identifiée comme impliquée dans l'adhérence aux cellules épithéliales [156].

Le pili de type IV HCP (hemorrhagic coli pilus) présent chez les EHEC O157:H7 permet la formation de longues fibres qui permettent l'adhérence à la

matrice des cellules épithéliales [157,158]. HCP contribuerait également à la formation de biofilm, à la motilité par « twitching » et à l'invasion cellulaire *in vitro* [157].

D'autres protéines sont suspectées comme ayant un rôle dans l'adhérence des EHEC O157:H7 comme Efa-1/LifA et son homologue ToxB [159,160].

L'autotransporteur Cah (calcium binding antigen 43 homolog) favorise l'agrégation cellule à cellule et la formation de biofilm [161]. Finalement, les autotransporteurs EhaA et EhaB sont également impliqués dans la formation de biofilm [162,163].

2.2. La Shiga toxine

La production de la Shiga toxine est une caractéristique des EHEC et est responsable des symptômes les plus graves des infections tels que le SHU et la colite hémorragique. Par conséquent, c'est le facteur de virulence des EHEC considéré comme le plus dangereux pour la santé humaine.

2.2.1. Types et sous-types de Stx

Les Shiga toxines sont classées en deux types immunologiquement distincts, Stx1 et Stx2, avec Stx1 existant en 3 sous-types (a, c et d) et Stx2 en 7 sous-types (a à g) [164]. Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologies avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* [165,166]. Les EHEC peuvent produire l'un ou l'autre des types de Stx, la combinaison des deux ou bien la combinaison de plusieurs sous-types. Les deux types de Stx peuvent mener au développement du SHU mais Stx2 est plus souvent associée à des maladies sévères selon les données épidémiologiques [167]. Parmi les variants Stx, Stx2 et Stx2c sont majoritairement portés par les EHEC O157:H7 et associés à des

cas sévères contrairement aux variants Stx2e et Stx2f [168]. Les STEC produisant Stx2e sont généralement pathogènes pour le porc provoquant la maladie de l'œdème [169].

2.2.2. Structure et mode d'action

Stx possède une structure de type AB₅ avec une sous-unité A de 32 kDa et 5 sous-unités B de 7.5 kDa qui forment un anneau pentamérique. La sous-unité A possède un domaine possédant une activité enzymatique et un domaine de liaison aux sous-unités B. La sous-unité B est responsable de la liaison de Stx avec son récepteur glycolipidique, le globotriaosylceramide (Gb3) [170,171]. La variante Stx2e a comme récepteur le Gb4. Le Gb3 est retrouvé à la surface des cellules glomérulaires rénales et de l'endothélium vasculaire. Suite à la fixation à son récepteur, Stx est internalisée dans la cellule par endocytose, atteint l'appareil de Golgi et voyage par voie rétrograde jusqu'au réticulum endoplasmique où la sous-unité A peut atteindre le cytoplasme (Figure 9) [172]. La sous-unité A possède une activité ARN-glycosidase qui enlève une adénine de l'ARNr 28S et provoque l'inhibition de la synthèse protéique et la mort cellulaire par apoptose [173]. Ceci provoque une thrombose au niveau des capillaires sanguins de l'intestin, causant une colite hémorragique, du cerveau, causant le PTT, et du rein, causant le SHU, ces organes étant particulièrement riches en récepteurs Gb3. De plus, l'attachement peut être augmenté par l'interaction de l'intimine avec la nucleoline, un récepteur à l'intimine localisé à la surface des cellules hôtes dont l'expression est augmentée par Stx2 [174].

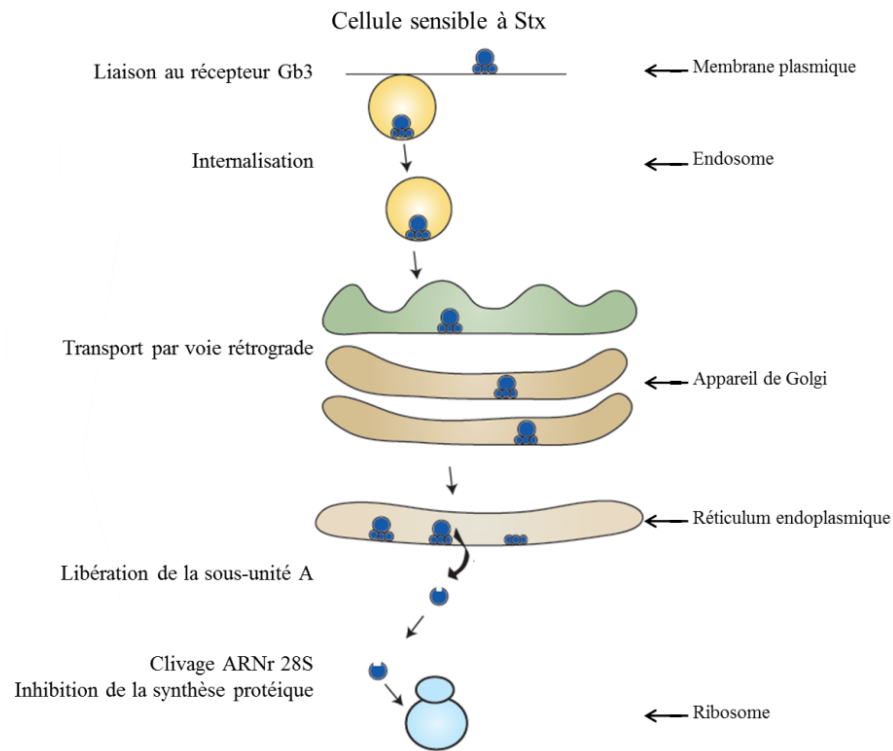


Figure 9. Mode d'action de la Shiga toxine. Selon Paton *et al.*, 2005 [175]. La Shiga toxine se lie à son récepteur, généralement le Gb3, est internalisée au sein des endosomes, transite par voie rétrograde de transport dans l'appareil de Golgi, atteint le réticulum endoplasmique où la sous unité A est libérée dans le cytosol. La sous unité A est responsable de l'inhibition de la synthèse protéique en inhibant l'activité des ribosomes.

2.2.3. Régulation génétique

Les gènes *stx* sont portés par des bactériophages de type lambda, fonctionnels ou non et intégrés dans le génome des EHEC [176,177]. La souche EHEC O157:H7 EDL933 produit Stx1 et Stx2 qui sont codées, respectivement, par les prophages CP-933P et BP933W. La régulation de l'expression des gènes *stx*

dépend des mécanismes de régulation génétique du phage (Figure 10). Les bactériophages lambda fonctionnels ont un cycle lysogénique pendant lequel le phage est incorporé au génome et demeure silencieux, et un cycle lytique pendant lequel l'ensemble des gènes phagiques sont exprimés, permettant la production des particules phagiques. Par conséquent, les gènes *stx* sont exprimés de façon basale lors de la phase lysogénique et exprimés fortement lors de la phase lytique.

L'induction de la phase lytique est subséquente à l'induction de la réponse SOS au sein de la bactérie. La réponse SOS se déclenche suite à l'apparition de dommages au niveau de l'ADN provoqués par un stress cellulaire [178]. La protéine inductrice de la réponse SOS est RecA. La protéine RecA détecte l'ADN endommagé, et notamment l'ADN simple brin, sur lequel elle se fixe pour former un filament protéique. Sous cette forme, RecA acquiert une activité protéase et interagit avec le régulateur transcriptionnel LexA qui s'autoclive. LexA est un répresseur transcriptionnel qui régule l'expression des gènes de la réponse SOS [179]. La protéine RecA induit également l'autoclivage du répresseur de l'entrée en phase lytique des phages lambda, la protéine CI. En phase lysogénique, le répresseur CI est fixé aux opérateurs présents sur les promoteurs des gènes précoces du phage, soit les promoteurs *pL* et *pR*, et inhibe l'entrée en phase lytique du phage [180]. L'autoclivage de CI conduit à l'expression des gènes précoces et à la production de l'antitermineur Q. Ce dernier permet l'expression des gènes de la phase tardive du phage dont les gènes *stx* à partir du promoteur *pR'*. Par conséquent, l'expression des gènes *stx* dépend grandement de l'induction de la réponse SOS et des stress cellulaires subits par la bactérie comme la variation de pH, l'irradiation aux UV ou bien l'exposition aux antibiotiques affectant l'ADN comme la mitomycine C ou les quinolones. Les gènes *stx* possèderaient également leur propre promoteur [181]. Les facteurs menant à l'expression des gènes *stx in vivo* ne sont pas identifiés même si la production de H₂O₂ par les neutrophiles est soupçonnée de jouer un rôle dans la production de Stx2 [182]. L'utilisation d'antibiotique est déconseillée pour les mêmes raisons, même si aucune

corrélation n'a été établie entre le traitement aux antibiotiques et le développement du SHU.

Il a été montré par Vareille *et al*, [183] que le NO inhibe la production d'un des facteurs de virulence principaux des EHEC: la production de Stx. Le NO endogène (produit par les cellules épithéliales) ou exogène (apporté par un donneur de NO dans le milieu), via NsrR favoriserait la transcription de facteurs qui empêcheraient l'activation de RecA ou diminueraient les dommages à l'ADN qui activent la réponse SOS et la phase lytique du phage BP-933W. D'autres facteurs intestinaux affectent la production de Stx. Le microbiote intestinal humain et plus particulièrement l'espèce *B. thetaiotaomicron*, réprime l'expression des gènes *stx*, en affectant RecA et la réponse SOS via la production de facteurs non-identifiés et de taille < 3 kDa [184].

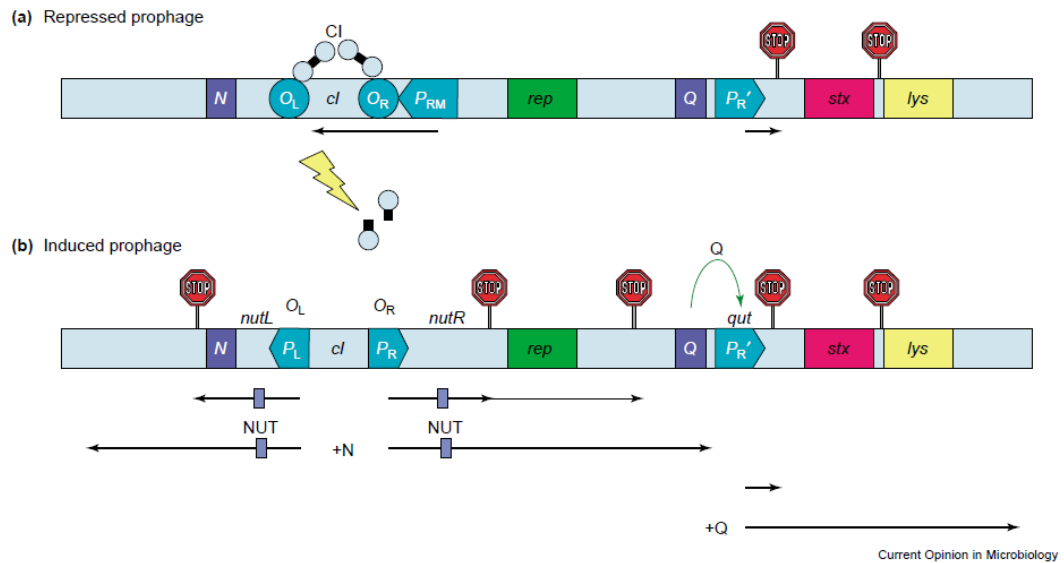


Figure 10. Région régulatrice de la lysogénie et de l'entrée en phase lytique des phages de type lambda codant pour les gènes *stx*. Selon Waldor et Friedman [180]. (a) phase de lysogénie : le facteur CI occupe les opérateurs O_L et O_R et initie la transcription depuis le promoteur P_{RM} ce qui permet la synthèse du facteur CI. Dans ces conditions, la protéine Q n'est pas synthétisée et la transcription qui est initiée à partir du promoteur $P_{R'}$ est arrêtée au niveau du premier terminateur. (b) phase lytique : l'induction de la réponse SOS induit l'autoclivage du facteur CI ce qui lève la répression lysogénique. La transcription précoce à partir des promoteurs P_L et P_R est initiée et permet la synthèse de la protéine N qui agit au niveau des sites NUT de l'ARN et modifie l'ARN polymérase en une forme qui transcende les terminateurs. Cela permet l'expression de la protéine Q qui agit au niveau du site *gut* de l'ADN pour modifier l'initiation de la transcription au niveau du promoteur $P_{R'}$ de telle sorte que les terminateurs ne sont plus fonctionnels. Ceci conduit à la transcription des gènes *stx* et *lys* ainsi que de la plupart des gènes requis pour la production d'une particule phagique fonctionnelle.

2.3. Autres facteurs de virulence

La toxine CDT (cytolethal distending toxin)

La toxine CDT est produite par plusieurs souches de *E. coli* dont des EHEC O157:H7 [185]. La toxine CDT induit de manière dose-dépendante l'arrêt du cycle cellulaire en endommageant l'ADN [186,187]. Il existerait une corrélation positive entre la présence de la toxine CDT et la capacité des souches EHEC non-O157 à provoquer des pathologies sévères [187].

L'entérohémolysine

L'entérohémolysine (Ehx), est codée par le gène *ehxA* présent sur le plasmide pO157 chez les EHEC O157:H7. Ehx est une toxine formant des pores menant à la lyse des cellules. Ehx a été montré comme étant cytotoxique pour les cellules endothéliales et pouvant contribuer au développement du SHU [188]. De plus, il a été montré qu'Ehx pouvait être inactivée par EspP, un autre facteur de virulence produit par certaines EHEC [189].

La sérine protéase EspP

EspP est l'autotransporteur le plus étudié chez les EHEC. La production de EspP a été associée avec des cas sévères de maladie causée par EHEC, entre autre par les sérotypes les plus virulents comme le sérotype O157:H7 [190]. EspP est une sérine protéase multifonctionnelle, clivant le facteur V de coagulation, la pepsine A [191], le complément [192] et l'entérohémolysine [189].

La mucinase StcE

StcE est une métalloprotéase à zinc dont le rôle dans la virulence est attribué à son activité mucinase qui permet la dégradation et la réduction de la

viscosité du mucus [193]. Le mucus est une barrière physique visant à empêcher le contact entre les bactéries et l'épithélium de l'hôte. Par conséquent, StcE permettrait aux EHEC de passer la barrière de mucus pour établir le contact avec l'épithélium et causer la maladie. De plus, StcE aurait un rôle à jouer dans l'évasion du système immunitaire. Une fois attaché aux cellules épithéliales du côlon, les EHEC forment des lésions A/E qui endommagent l'épithélium ce qui provoque une infiltration des leucocytes [194]. StcE cible spécifiquement les glycoprotéines de surface CD45 et CD43 des leucocytes, dont la glycosylation ressemble à celle de la mucine, ce qui confère au pathogène la capacité à moduler le système immunitaire de l'hôte [195]. La perte des glycoprotéines sialylées due à l'activité protéolytique de StcE prévient la migration des cellules immunitaires au niveau du site d'infection ainsi que la mise en place d'une réponse inflammatoire appropriée. En effet, les neutrophiles traités avec StcE sont défaillants au niveau du chimiotactisme [195].

3. Niche écologique et nutritionnelle des EHEC chez les mammifères

3.1. Niche écologique

3.1.1. Chez le bovin

Le tractus intestinal bovin est le réservoir majeur d'EHEC et fait, par conséquent, l'objet de plusieurs études visant à déterminer les sites préférentiels de persistance et de prolifération du pathogène. Comme mentionné plus haut, les EHEC ont été détectés dans plusieurs compartiments du tractus intestinal de l'animal [23]. Les EHEC sont tout d'abord retrouvés dans la cavité orale des

bovins puis dans le rumen, qui est le premier compartiment du tractus intestinal bovin après l'œsophage [196]. Le rumen contient généralement peu de *E. coli*, c'est à dire moins de 10^6 cellules /mL pour une population bactérienne totale d'environ 10^{10} cellules /mL, et ceci serait dû en partie à une concentration importante d'acides gras volatiles qui inhibent la croissance de la bactérie [197-199]. Le rumen est généralement considéré comme un compartiment de transit pour les EHEC [200,201]. Cependant, chez les bovins infectés naturellement, le pathogène est également retrouvé associé à la paroi du rumen, indiquant sa capacité à adhérer à la muqueuse [23,198]. Le rumen contient des AHLs produits par la flore endogène qui préparent les EHEC O157:H7 au passage à travers l'abomasum en déclenchant l'activation des gènes de résistance à l'acidité via le régulateur transcriptionnel SdiA [112]. Le tractus intestinal inférieur, incluant le petit et le gros intestin, est un environnement plus favorable à *E. coli* et dans lequel les EHEC sont le plus souvent isolés [202]. D'ailleurs, le contenu du petit intestin bovin constitue un milieu favorable à la croissance des EHEC O157:H7 [5,6]. Même si les EHEC sont parfois isolées de l'épithélium du tractus intestinal inférieur, le pathogène se retrouve généralement davantage dans le contenu digestif [198]. La partie terminale du colon est considérée comme le site majeur de colonisation des EHEC O157:H7 et plus particulièrement les tissus lymphoïdes situés au niveau de la jonction recto-anale [22,203]. Les EHEC O157:H7 sont capables d'adhérer intimement au niveau des jonctions recto-anales chez le bovin et ce processus pourrait être à l'origine du phénomène passager de « super-sécrétion » du pathogène [28,204,205].

3.1.2. Dans le modèle souris

Les souris traitées à la streptomycine représentent un modèle *in vivo* d'étude de la colonisation intestinale des *E. coli* commensales et pathogènes. L'inoculation par voie orale de la streptomycine chez la souris réduit le nombre

d'anaérobies facultatifs au sein du microbiote intestinal tout en affectant peu le nombre d'anaérobies stricts [206]. L'élimination des anaérobies facultatifs contribue à l'élimination des compétiteurs d'*E. coli*. Ainsi, ce modèle possède l'avantage d'augmenter la capacité de colonisation intestinale d'*E. coli* chez les souris et permet l'étude des mécanismes de colonisation en présence d'un microbiote intestinal complexe [207]. Ce modèle a également permis l'étude de la niche écologique d'*E. coli* O157:H7 au sein d'un environnement intestinal complexe. Il a été établi que chez les souris traitées à la streptomycine, les *E. coli* commensale et entérohémorragique de sérotype O157:H7 occupent préférentiellement le mucus du cæcum et du colon [8]. De plus, alors que *E. coli* K12 MG1655 est retrouvée exclusivement dans le mucus, la souche EHEC O157:H7 EDL933 est également observée en contact étroit avec les cellules épithéliales de l'hôte [8].

3.2. Niche nutritionnelle

3.2.1. Les sucres dérivés de la mucine

L'épithélium du tractus intestinal est recouvert d'une couche de mucus composé principalement de glycoprotéines. Le mucus constitue une barrière physique limitant le contact entre les bactéries et les cellules épithéliales. Les glycoprotéines du mucus sont constituées d'une multitude de sucres et sont très diversifiées de par leur composition [208]. L'ensemble des glycoprotéines forme la mucine. Les sucres présents dans la mucine peuvent être relâchés dans le contenu intestinal sous l'action des glycosidases produites par le microbiote intestinale et servir de source de carbone pour les bactéries commensales et pathogènes [209].

Plusieurs études de transcriptomique ont mis en évidence l'importance des voies métaboliques requises pour l'utilisation des composés de la mucine lors de l'incubation des EHEC O157:H7 dans le milieu intestinal [5,7].

Dans un milieu de culture contenant un assortiment de sucres dérivés de la mucine intestinale, les *E. coli* commensale et pathogène tel que *E. coli* O157:H7 sont capables de co-métaboliser le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le gluconate, le galactose, l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), le mannose, le galacturonate, le glucuronate, l'arabinose, le ribose, le glucosamine, le maltose, le fucose et le N-acétylgalactosamine (GalNAc) [7]. Alors que la souche *E. coli* O157:H7 EDL933 métabolise *in vitro* les mêmes sucres que la souche K12 MG1655, les deux souches catabolisent les sucres dans un ordre préférentiel différent [7]. Cependant, ces deux souches semblent cataboliser en priorité le GlcNAc suivi du gluconate, du galactose et du Neu5Ac, et en dernier lieu le glucosamine, le fucose et le maltose [7]. *In vivo*, chez les souris traitées à la streptomycine, la colonisation intestinale de la souche EDL933 repose sur sa capacité à cataboliser l'arabinose, le fucose, le galactose, le mannose, le GlcNAc et le ribose [7].

Les EHEC O157:H7 sont bien adaptés au contenu intestinal du petit intestin bovin (BSIC) et cela se traduit par une croissance rapide en présence du microbiote intestinal endogène [5]. Il a été montré que le BSIC contient une quantité importante de monosaccharides dérivés de la mucine avec une concentration totale de 4.2 mM [5]. La capacité d'*E. coli* O157:H7 à croître rapidement dans le BSIC repose sur sa capacité à consommer plusieurs monosaccharides incluant le galactose, le GlcNAc, le GalNAc, le fucose, le mannose et le Neu5Ac [5]. De plus, *E. coli* O157:H7 consommerait plus rapidement ces monosaccharides comparé à la souche commensale *E. coli* BG1 isolée du tractus intestinal bovin.

L'ensemble de ces observations démontre l'importance des composés issus de la mucine pour la colonisation intestinale des EHEC chez différents hôtes mammifères.

3.2.2. Les substrats de la néoglucogenèse

La néoglucogenèse est l'ensemble des réactions métaboliques qui mènent à la synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques (pyruvate, lactate, la plupart des acides aminés...). Les substrats de la néoglucogenèse ont été suggérés comme étant importants pour la colonisation intestinale des EHEC O157:H7 chez la souris et pour la croissance du pathogène dans le BSIC [6,8]. Chez les souris traitées à la streptomycine, alors que la souche EHEC O157:H7 EDL933 utilise de préférence les voies de la glycolyse pour sa croissance initiale et son maintien dans l'intestin en absence d'autres *E. coli*, en présence de *E. coli* K12 MG1655, le pathogène se rabat sur les voies de la néoglucogenèse pour maintenir sa colonisation intestinale [8]. Les auteurs suggèrent que le pathogène est moins efficace que la souche K12 pour utiliser les substrats glycolytiques dans l'intestin et que l'utilisation des substrats de la néoglucogenèse est une alternative pour maintenir un certain fitness. De façon similaire, d'après des données de transcriptomique supportées par de la mutagenèse dirigée, il a été montré que la voie de la néoglucogenèse est importante pour le maintien de la souche EHEC O157:H7 EDL933 dans le BSIC [6]. Plusieurs substrats de la néoglucogenèse présents dans le BSIC tels que le glycérol (5.8 mM), le lactate (3.6 mM), l'aspartate (2.4 mM) et la sérine (1.9 mM) sont soupçonnés de jouer un rôle dans le maintien du pathogène dans le BSIC et pourraient participer à la colonisation intestinale des EHEC chez le bovin [6].

3.2.3. L'éthanolamine

L'éthanolamine (EA) provient du phosphatidylethanolamine qui est le plus abondant phospholipide des membranes bactériennes et un des plus abondants des membranes eucaryotes. L'opéron *eut*, requis pour la dégradation de l'EA est présent chez *E. coli* commensales et pathogènes mais faiblement exprimé chez les souches non-pathogènes [116]. Par conséquent, l'EA qui est consommé par les

EHEC, est faiblement utilisé par les souches d'*E. coli* commensales. L'opéron *eut* est absent de la plupart des génomes des espèces du microbiote intestinal mammifère. Toutefois, quelques bactéries de l'embranchement des *Firmicutes* (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium* spp.) possèdent une modeste similitude de séquence avec l'opéron *eut* des EHEC. Cependant, l'éthanolamine est faiblement consommé par le microbiote endogène bovin. Dans le BSIC, les gènes *eut* sont fortement activés chez la souche EHEC O157:H7 EDL933 et cela corrèle avec l'utilisation de l'EA dans le milieu intestinal. Ainsi, il a été démontré que les EHEC O157:H7 tirent l'avantage de l'utilisation de l'EA comme source d'azote pour croître dans le BSIC [116]. De plus, tel que mentionné plus haut, l'éthanolamine contribue à l'activation des gènes du LEE via le régulateur EutR [115,210].

4. Le microbiote intestinal humain

4.1. Composition

Le microbiote intestinal est principalement constitué de bactéries dont le nombre est estimé à 10^{14} individus, distribués tout au long du tractus intestinal [211]. Le nombre d'espèces bactériennes présentes dans l'intestin varie d'une étude à l'autre, mais en général il est estimé que l'intestin mammifère comporte entre 500 et 1 000 espèces [212]. La charge bactérienne est inégalement répartie dans l'intestin avec 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu dans l'estomac et le duodénum, 10^4 à 10^7 bactéries par gramme dans le jéjunum et l'iléum et 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme dans le colon (Figure 11) [213]. L'ensemble du microbiote intestinal contient au moins 100 fois plus de gènes que le génome humain [211].

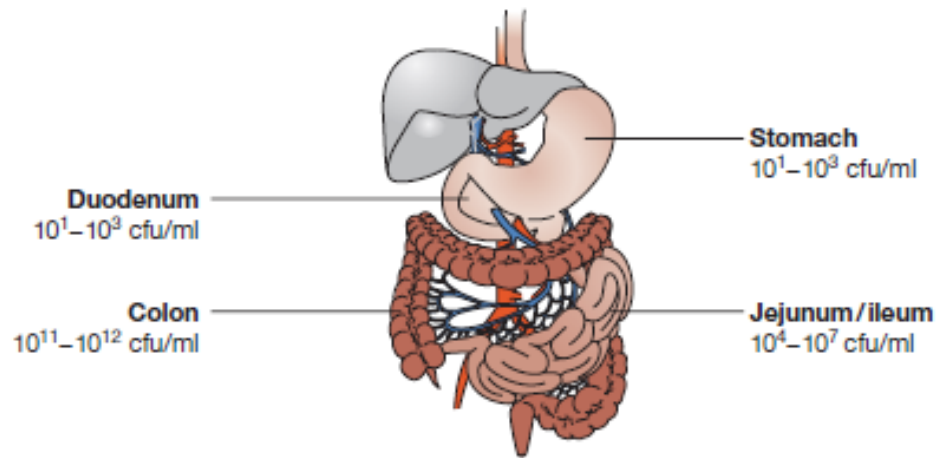


Figure 11. Concentration bactérienne dans le tractus intestinal humain. Selon O'Hara *et al.* [213]. Le tractus intestinal est colonisé par environ 10^{14} bactéries. Un gradient croissant de la concentration en bactérie est observé de l'estomac jusqu'au colon où la concentration peut atteindre 10^{11} à 10^{12} bactéries par mL.

Le microbiote intestinal humain est dominé par deux embranchements bactériens, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* qui à eux seuls totalisent environ 90% de la composition du microbiote [214]. Les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont des anaérobies stricts et représentent respectivement environ 64 % et 23 % des bactéries du microbiote intestinal. D'autres embranchements bactériens sont également représentés tels que les *Proteobacteria* (8 % des bactéries), les *Verrucomicrobia*, les *Actinobacteria*, les *Fusobacteria* et les *Cyanobacteriae* [214,215]. Les *Archeobacteria* peuvent être également retrouvés au sein du microbiote [215]. Le microbiote intestinal influence de différentes façons la physiologie de l'hôte.

4.2. Rôles physiologiques

4.2.1. La digestion

4.2.1.1. Dégradation des polysaccharides

La dégradation des polysaccharides est une activité importante du microbiote du colon. Certains polysaccharides sont dégradés uniquement par des bactéries spécialisées, considérées comme des dégradeurs primaires. Plusieurs études ont mis à jour les mécanismes employés par ces bactéries pour dégrader les polysaccharides. *Ruminococcus bromii* fait partie de l'embranchement des *Firmicutes* et jouerait un rôle important dans l'écosystème du colon en dégradant l'amidon résistant [216]. D'autres bactéries sont hautement spécialisées dans la dégradation des polysaccharides. C'est le cas de *Bacteroides thetaiotaomicron* qui est une espèce prédominante parmi les *Bacteroidetes* du microbiote et qui possède de nombreux systèmes de dégradation des polysaccharides. Ces systèmes sont codés par des PULs (Polysaccharides Utilization Loci) dont les séquences génétiques représentent 18% du génome de *B. thetaiotaomicron* [217,218]. Ces systèmes sont homologues au système Sus (Starch Utilization System), qui fût le premier à être caractérisé, et possèdent des affinités particulières pour différents polysaccharides [218].

4.2.1.2. Production des acides gras volatiles (AGV)

La fermentation est la principale fonction du microbiote intestinal. La transformation des polysaccharides et des monosaccharides génère des AGV dont les plus abondants sont le butyrate, l'acétate et le propionate. D'autres AGV moins abondants peuvent être produits par le microbiote tel que le lactate, le succinate et

le formate. La production des AGV est bénéfique pour l'hôte car elle constitue une source d'énergie et contribue de façon importante à la physiologie intestinale [219].

4.2.2. Synthèse de vitamines

L'apport en vitamine est essentiel pour la santé de l'hôte. Les deux sources en vitamines sont l'alimentation et le microbiote intestinal. En effet, les bactéries sont capables de synthétiser une grande variété de vitamines telles que la biotine (vitamine H), les vitamines B et la vitamine K. Les voies métaboliques de synthèse du folate (vitamine B9), de la thiamine (vitamine B1), de la pyridoxine (vitamine B6) ainsi que de la cobalamine (vitamine B12) sont fortement représentées dans le métagénome du microbiote intestinal humain [211].

4.2.3. Vascularisation intestinale

Il a été montré que le microbiote intestinal stimule l'angiogenèse intestinale. La vascularisation des intestins chez des souris axéniques est peu développée par rapport à celle de souris conventionnelles [220]. Dans la même étude, la restauration d'un microbiote intestinal de souris conventionnelles ou bien l'inoculation de *B. thetaiotaomicron* seule, chez les souris axéniques, rétablit le développement de l'angiogenèse intestinale. Plus spécifiquement, *B. thetaiotaomicron* induit la vascularisation en stimulant les cellules de Paneth [220].

4.2.4. Résistance à la colonisation intestinale des pathogènes

Les bactéries pathogènes colonisant le tractus intestinal se confrontent inévitablement au microbiote intestinal et à son activité métabolique. Le microbiote intestinal limite la colonisation intestinale des pathogènes entériques. Les mécanismes de résistance à la colonisation sont divers (Figure 12). En plus d'être une barrière physique importante, le microbiote influence l'immunité de l'hôte, sécrète des composés inhibiteurs, rend indisponible les nutriments en occupant de façon importante la niche nutritionnelle et influence l'expression des gènes de virulence des pathogènes.

4.2.4.1. Régulation de l'immunité

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont sécrétés par les cellules de Paneth situées à la base des cryptes et font partie de l'immunité innée. Plusieurs AMPs sont produits dans l'intestin tels que les défensines, les cathelicidines et les lectines de type C. Ces peptides endommagent la structure de surface des bactéries pathogènes et commensales et permettent la régulation du nombre et de la composition en bactérie du microbiote [221]. La présence du microbiote intestinal est requise pour une production optimale des AMPs [222,223]. Par conséquent, le microbiote intestinal augmente l'exposition des pathogènes aux AMPs. Il a été démontré que le microbiote intestinal de souris résistantes aux infections à *C. rodentium* induisait une plus forte expression des AMP Reg3 γ et Reg3 β par rapport au microbiote intestinal des souris sensibles [224]. De plus, le transfert du microbiote intestinal de souris résistantes aux souris sensibles rend ces dernières résistantes aux infections à *C. rodentium* et augmente la production des AMP Reg3 γ et Reg3 β [224]. Dans le cas des infections à *Clostridium difficile*, qui sont généralement causées par une perte de la diversité microbienne dans l'intestin, la transplantation d'un microbiote intestinal provenant d'un individu sain chez un patient permet l'élimination du pathogène [225]. Les mécanismes permettant la

résistance à la colonisation contre *C. difficile* ne sont pas très bien connus mais sembleraient impliquer différents processus de l'immunité innée et adaptative de l'hôte [226].

4.2.4.2. Production de bactériocines

Les bactériocines jouent un rôle dans la compétition entre bactéries et peuvent inhiber les pathogènes intestinaux [227]. Les bactériocines sont des composés protéiques classés en 4 groupes : la classe I des lantibiotiques, petits peptides qui subissent des modifications post-traductionnelles, la classe II comprend des petits peptides thermostables qui ne sont pas modifiés au niveau post-traductionnel, la classe III constituée de protéines thermosensibles et la classe IV qui sont des grandes protéines complexes. Les bactériocines ont différents modes d'action tel que l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, la formation de pores dans la membrane bactérienne ou bien l'inhibition de l'expression génétique ou de la synthèse protéique [227].

4.2.4.3. Compétition nutritionnelle

Afin de coloniser le tractus intestinal, les pathogènes doivent trouver une niche nutritionnelle. Le microbiote intestinal est composé d'espèces qui acquièrent de façon efficace les nutriments et qui occupe de façon importante la niche nutritionnelle empêchant l'installation des pathogènes. L'hypothèse de la niche nutritionnelle, émise par Freter, énonce que la colonisation intestinale d'une espèce bactérienne donnée requière un taux de croissance plus élevé que son taux d'élimination de l'intestin ainsi qu'une meilleure utilisation de nutriments limitant par rapport aux autres espèces bactériennes [228]. Plusieurs études ont été menées à ce sujet et plus particulièrement sur l'influence des *E. coli* commensaux sur la capacité des EHEC O157:H7 à coloniser le tractus intestinal de souris [2,3].

Comme mentionné plus haut, *E. coli* consomme plusieurs sucres relâchés de la mucine intestinale et ces derniers sont utilisés dans un ordre préférentiel particulier en fonction de la souche concernée [7]. De plus, l'inactivation des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation de ces sucres affecte différemment la colonisation intestinale des souches commensales et pathogènes [7]. L'ensemble de ces observations montre que les souches d'*E. coli* ont évolué de telle sorte qu'elles se différencient par leur efficacité à cataboliser les nutriments *in vivo*. Ainsi, l'inoculation des souris traitées à la streptomycine de plusieurs souches de *E. coli* commensales occupant la niche nutritionnelle de *E. coli* O157:H7 empêche la colonisation intestinale du pathogène [3]. Outre la compétition pour les sucres de la mucine, la compétition pour la proline serait un autre mécanisme par lequel les *E. coli* commensales contribueraient à l'élimination intestinale des EHEC O157:H7 [229]. Généralement les commensaux sont plus efficaces pour consommer les substrats les plus énergétiques. Dans le modèle de souris traitées à la streptomycine, il a été mis en évidence que *E. coli* K12 est plus efficace que la souche EHEC O157:H7 EDL933 à consommer *in vivo* les substrats glycolytiques et qu'en présence de *E. coli* K12, le maintien intestinal de EDL933 repose sur l'utilisation de nutriments moins énergétiques tels les substrats de la néoglucogenèse [8].

L'alimentation peut également affecter la colonisation intestinale des pathogènes. Alors qu'une alimentation riche en polysaccharides et pauvre en monosaccharides permet la cohabitation de *B. thetaiotaomicron* avec le pathogène intestinal de souris, *Citrobacter rodentium*, lorsque les deux individus sont en présence d'une alimentation pauvre en polysaccharides et riche en monosaccharides, *B. thetaiotaomicron* élimine le pathogène de l'intestin [230].

4.2.5. Influence sur la virulence des pathogènes

Le microbiote intestinal, via son activité métabolique, module l'expression des gènes de virulence des pathogènes. Chez les EHEC O157:H7, l'expression des gènes du LEE est finement régulée en réponse aux métabolites dérivés du microbiote ce qui influence le phénotype d'adhérence aux cellules épithéliales et la colonisation intestinale. De plus, plusieurs facteurs affectent la production de la Shiga toxine.

Via la production de butyrate

Le butyrate est un produit de la fermentation présent en concentration élevée dans le colon [231]. Le butyrate est un composé qui active l'expression des gènes du LEE chez les EHEC O157:H7 [232,233]. Le mécanisme de régulation implique la protéine Lrp qui active l'expression du régulateur transcriptionnel LeuO en présence de butyrate. LeuO se fixe directement sur le promoteur de *ler* pour augmenter sa transcription ainsi que le phénotype d'attachement aux cellules épithéliales [232].

Via le quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme largement utilisé par les bactéries et qui permet une régulation coordonnée de l'expression de certains gènes par le biais de molécules signales appelées des autoinducteurs.

Les AHLs sont des autoinducteurs produits par les bactéries à Gram négatif. Le mécanisme de quorum sensing le plus connu est celui existant chez *Vibrio fischeri* et qui fait intervenir la production d'AHLs. Chez *V. fischeri* le système LuxI-LuxR est responsable de la production de la luciférase en réponse aux AHLs, avec LuxI permettant la production d'AHLs et LuxR étant le senseur de ces AHLs et le régulateur transcriptionnel des gènes *lux* dont celui codant pour la luciférase. Il a été démontré que les AHLs sont produits par les bactéries commensales du rumen chez les bovins et induisent la répression des gènes du

LEE via SdiA chez les EHEC, tel que mentionné plus haut [113]. Un défaut de détection de ces AHLs chez un mutant $\Delta sdiA$ induit un défaut de colonisation des EHEC O157:H7 chez le bovin [113].

Un autre autoinducteur produit par le microbiote et dont la structure chimique n'est pas identifiée est soupçonné de jouer un rôle dans la colonisation intestinale des EHEC via la régulation des gènes du LEE. C'est l'autoinducteur 3 (AI-3), dont la production dépend du gène *luxS* chez *E. coli*, qui active les gènes du LEE via le senseur histidine kinase QseC [234,235]. QseC est impliqué dans l'activation des gènes du LEE et dans l'activation des gènes *stx* via QseF [121].

Via la production d'indole

La dégradation du tryptophane sous l'action de la tryptophanase mène à la production d'indole chez *E. coli*. L'indole et plusieurs de ses dérivés montrent une capacité à inhiber la formation des lésions A/E ainsi que la production de Stx chez les EHEC [236]. De plus, l'indole affecte d'autres phénotypes potentiellement importants pour la pathogénèse des EHEC tel que la formation de biofilm et la motilité [236,237].

Via le fucose

La mucine intestinale est hautement fucosylée. La fucosylation de la mucine est stimulée par le microbiote intestinal dont *B. thetaiotaomicron* [238]. Cette même espèce, après avoir stimulé la production de glycoprotéines fucosylées est capable de cliver le fucose de la mucine pour l'utiliser comme source de carbone [117,238]. Par ce même mécanisme, *B. thetaiotaomicron* rend disponible le fucose pour les autres espèces bactériennes. Le fucose une fois libéré est détecté par les EHEC O157:H7 via le système à deux composants FusKR et mène à la répression des lésions A/E [117].

Via des composés non-identifiés

L'activité métabolique du microbiote intestinal humain cultivé *in vivo* dans des rats initialement axéniques mène à l'inhibition, *in vitro*, des gènes codant pour Stx2 chez les EHEC O157:H7 [184]. Dans ces conditions, l'inhibition de l'expression des gènes *stx* semble dépendante de l'inhibition de l'expression du gène codant pour RecA, la protéine inductrice de la réponse SOS et de l'expression des gènes *stx*. L'espèce *B. thetaiotaomicron* est impliquée dans l'inhibition des gènes *stx2* dans ce modèle et un composé de masse moléculaire inférieure à 3 kDa jouerait un rôle dans cette l'inhibition [184].

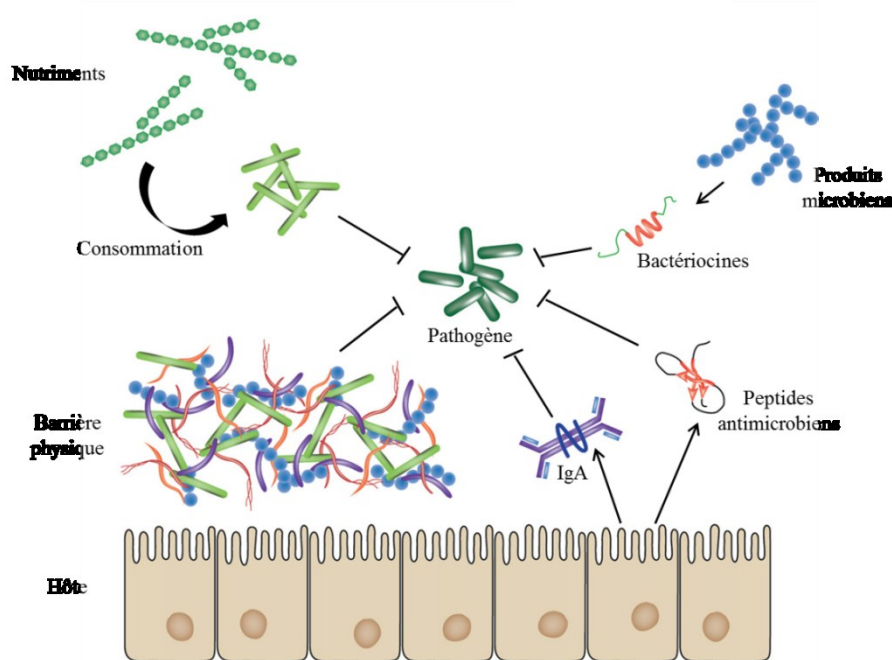


Figure 12. Mécanismes de résistance à la colonisation des pathogènes intestinaux. Selon Britton *et al.* [239]. Le microbiote intestinal limite la colonisation intestinale des pathogènes de différentes façon : par sa présence physique, par la stimulation du système immunitaire, par la production de bactériocines et par la compétition nutritionnelle. De plus, le microbiote intestinal modifie l'expression des gènes de virulence des pathogènes.

4.3. Déséquilibre du microbiote intestinal

La composition du microbiote intestinal est un facteur contribuant à l'homéostasie intestinale. Un traitement aux antibiotiques tels que la vancomycine ou bien la streptomycine affecte la composition du microbiote intestinale des souris conventionnelles ce qui les rend plus susceptibles à une infection à *Salmonella* serovar Typhimurium [240]. De la même façon, des souris traitées avec le métronidazole sont plus susceptibles à une infection à *C. rodentium* et ceci serait lié à une diminution de la couche de mucus intestinal [241]. Outre l'effet des antibiotiques, une infection bactérienne intestinale modifie la composition du microbiote ce qui peut amplifier la sévérité de l'infection. Une infection de souris à *C. rodentium* modifie la composition en plusieurs espèces bactériennes avec une augmentation du nombre de Protéobactéries, et de *Deferribacteres* et une réduction du nombre de *Lactobacillus* [242].

4.4. Composition et activité métabolique du microbiote intestinal humain chez le rat

Les rats inoculés avec le microbiote intestinal humain sont fréquemment utilisés pour étudier les interactions entre l'hôte et les microorganismes [184,243-245]. Plus généralement, les rongeurs associés au microbiote intestinal humain représentent un modèle d'étude pertinent à plusieurs niveaux pour étudier le microbiote intestinal du donneur humain. Ce modèle offre de nombreux avantages dont une bonne conservation de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal humain [243,246,247]. Il est généralement admis que les espèces prédominantes du microbiote intestinal humain sont conservées sur le long terme chez l'animal. Par la méthode de PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) il a été démontré que la composition du microbiote intestinal associé au rat, par rapport à celle du donneur humain, conserve un

coefficient de similarité (Cs) supérieure à 75 % après un an, ce qui démontre sa stabilité sur le long terme [243]. Au niveau de l'activité métabolique, il a été rapporté par Hirayama *et al.* [246] que la composition en métabolites chez les souris associées au microbiote intestinal humain ressemble davantage à celle de l'homme qu'à celle des souris conventionnelles. Par exemple, les activités β -glucosidase et β -glucuronidase, impliquées dans la dégradation des polysaccharides, sont identiques chez l'humain et chez les souris associées au microbiote intestinal humain, mais différentes de celle des souris conventionnelles. Toutefois, des différences peuvent être observées: la concentration des AGV chez les souris associées au microbiote humain est moins importante que chez l'humain, mais demeure plus élevée que la concentration en AGV des souris conventionnelles [246]. Néanmoins, l'utilisation des rongeurs pour l'étude de l'activité métabolique du microbiote intestinal humain en association *in vivo* avec l'hôte mammifère demeure le modèle le plus fiable.

Problématique et objectifs

Les EHEC colonisent le tractus intestinal humain et sont capables de causer la maladie à partir d'une faible dose infectieuse. Ceci suggère que le pathogène est hautement adapté à l'environnement intestinal et que cela se traduit entre autres par l'acquisition d'une niche nutritionnelle et une régulation optimale des gènes de virulence. Cependant, le tractus intestinal est occupé par le microbiote intestinal qui occupe une grande partie de la niche nutritionnelle et empêche la colonisation des pathogènes. Par conséquent, ceci soulève beaucoup de questions quant aux stratégies des EHEC à s'adapter à la présence du microbiote intestinal. De plus, le microbiote intestinal est capable de réguler la virulence des pathogènes par des mécanismes encore méconnus et qui pourraient jouer un rôle important dans le développement de la maladie causée par EHEC [184].

Ainsi, mes travaux de doctorat avaient pour objectifs de décrire les adaptations métaboliques des EHEC en réponse à l'activité métabolique du microbiote intestinal et de caractériser les mécanismes de régulation menant à la régulation microbiote-dépendante des gènes de virulence des EHEC.

Section III- Méthodologie et Résultats

Implication de l'auteur dans cet article

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué la majorité des expérimentations, j'ai analysé les résultats et j'ai écrit le manuscrit. L'inoculation des rats avec le microbiote intestinal humain, l'euthanasie des animaux et la récupération des caecum de rats ont été réalisés par Christophe Del'Homme du centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix, et plusieurs cultures de EDL933 ont été réalisées par Philippe Garneau. L'hybridation des ADN complémentaires a été réalisée par le centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill. La mesure des concentrations des métabolites intestinaux par spectrométrie de masse a été réalisée par Francis Beaudry.

1. Article I

Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 grown *in vitro* in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes

Cet article a été accepté dans le journal *Microbes and Infection* (2014)

Accepted 19 september, 2014.

Authors

Guillaume Le Bihan^a, Grégory Jubelin^{b*}, Philippe Garneau^a, Annick Bernalier-Donadille^b, Christine Martin^b, Francis Beaudry^c, Josée Harel^{a*}

Adresses

^aCentre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (CRIPA), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

^bINRA, UR454 Unité de Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^cGroupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

*Corresponding authors mail to:

- Josée Harel. Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc
(GREMIP), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-
Hyacinthe, QC, Canada

Phone: 450 773 8521 # 8233

Fax: 450 778 8108

- Grégory Jubelin. INRA, UR454 Unité de Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-
Champanelle, France

Phone: (33) 4 73 62 42 43

Fax: (33) 4 73 62 45 81

1.1. Abstract

In developed countries, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a leading cause of bloody diarrhea and renal failures in human. Understanding strategies employed by EHEC to colonize the intestine is of major importance since to date no cure exists to eradicate the pathogen. In this study, the adaptive response of EHEC to the intestinal milieu conditioned by a human microbiota was examined. A transcriptomic analysis was performed on the EHEC strain EDL933 incubated *in vitro* in the sterile-filtrated cecal content of human microbiota-associated rats (HMC) compared with EDL933 incubated in the sterile-filtrated cecal content of germ-free rat (GFC). EDL933 switches from a glycolytic metabolic profile in the GFC to an anaplerotic metabolic profile in HMC. The expression of several catabolism genes was strongly affected such as those involved in the utilization of sugars, glycerol, N-acetylneuraminic acid, amino acids and secondary metabolites. Interestingly, expression level of critical EHEC O157:H7 virulence genes including genes from the locus of enterocyte effacement was reduced in HMC. Altogether, these results contribute to the understanding of EHEC adaptive response to a digestive content and highlight the ability of the microbiota to repress EHEC virulence gene expression.

Keyword: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; Transcriptome; Intestinal milieu; Metabolism; Virulence

1.2. Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a human foodborne pathogen that is frequently responsible for infectious outbreaks in developed countries. EHEC infections can lead to hemorrhagic colitis and to the life-threatening haemolytic and uremic syndrome. In humans, EHEC O157:H7 targets the epithelium of the large intestine. There, it produces attaching and effacing lesions (AE lesions) that are characterized by an intimate attachment of the bacteria to the epithelial cells and the formation of a pedestal structure. Among the wide range of virulence genes of EHEC, the locus of enterocyte effacement (LEE) is composed of five operons encoding for a type III secretion system (T3SS) and type III secreted (T3S) effectors, both needed for the formation of AE lesions and to damage the colonic epithelium [1]. AE lesions involve the LEE genes *eae* and *tir* encoding respectively for the adhesin Eae and its specific T3S receptor Tir, injected into the host cell [1]. Additionally, numerous genes are distributed on pathogenicity islands, distinct from the LEE, that encode for T3S effectors critical for EHEC pathogenicity [2]. However, the more severe symptoms of EHEC infection depends on the production of the Shiga toxin (Stx), an AB5 toxin that is associated with haemolytic and uremic syndrome development [1].

The gut microbiota is a complex symbiotic consortium of hundreds of bacterial species contributing to the intestinal homeostasis and host health, and acting as a barrier to prevent the proliferation of enteric pathogens, a phenomenon called colonization resistance [3, 4]. Ecological forces that shaped the intestinal microbiota led to the emergence of bacterial species that have evolved specific mechanisms to efficiently exploit available nutrients [3, 5, 6]. Therefore, incoming pathogens need to develop strategies to adapt to the presence of the microbiota. Using *in vitro* bovine small intestinal content, we have shown that the EHEC strain EDL933 is able to simultaneously catabolise several mucus-derived sugars [7]. Similarly, the important nitrogen source, ethanolamine released from phospholipid

included in animal, plant and microbial cell membranes, favours EDL933 persistence in the bovine small intestine [8]. *In vivo* investigations of the carbon nutrition of EDL933 have shown that gluconeogenic substrates are important for the intestinal colonization of the pathogen especially during competition with commensal *E. coli* [9]. The capacity of EHEC to adapt to nutrient availability and environmental conditions is the key for their residence time and survival.

The ability of attaching and effacing pathogens (AE pathogens) to adhere intimately to intestinal epithelial cells relies on the expression of the LEE genes [5]. As an AE pathogen, EHEC O157:H7 has acquired mechanisms to sense the environment leading to the proper regulation of LEE genes [10]. Since a range of intestinal compounds affects the expression of virulence genes of EHEC O157:H7 [11] and that the intestinal microbiota largely influence the intestinal metabolome [12], the expression of EHEC virulence genes in the intestinal content of mammal needs to be investigated.

Human microbiota associated rats are frequently used as a model to study host microbe interactions [13]. To decipher the ways ensuring EHEC adaptation to an intestinal environment, we investigated the transcriptome of EHEC EDL933 grown *in vitro* in a human microbiota-associated rat's cecal content (HMC) and in a germ-free rat's cecal content (GFC). Our results highlighted a clear metabolic switch from a glycolytic to an anaplerotic profile, after the growth of EHEC EDL933 in HMC, as well as an inhibition of the expression of a large number of virulence genes involved in AE lesion formation. These results contribute to understand how a pathogen such as EHEC adapts to an intestinal environment through coordinated transcriptome reorganization. Moreover, our data also highlight the ability of the gut microbiota to repress EHEC virulence gene expression, a mechanism contributing to colonization resistance.

1.3. Results

Gene expression patterns of EHEC EDL933 after *in vitro* growth in the sterilized cecal contents of germ-free or human gut microbiota-associated rats

To determine the effect of an intestinal environment on EHEC gene expression, the transcriptome of the strain EDL933 grown *in vitro* in HMC was compared to the transcriptome of EDL933 grown in GFC. Statistical analysis of microarray data identified 408 and 669 genes that were up- and down-regulated respectively in HMC relative to GFC, representing 19.8% of the total number of genes of the EHEC EDL933 genome.

The relative changes in gene expression ranged from a 6.6-fold increase to a 265.5-fold decrease during growth of EDL933 in HMC compared with GFC. Interestingly, genes belonging to the glutamate-dependent acid resistance (GDAR) system were down-regulated as *gada* and *gadB*, both encoding for a glutamate decarboxylase, together with *gadC* and *gadE* encoding for the glutamate/ γ -aminobutyric acid transporter and the transcriptional regulator of the GDAR system were down-regulated by 265.5-, 130.2-, 30.6- and 28.8-fold respectively (Table 1). This was associated with a higher acidification of GFC (pH 5.5) as compared to HMC (pH 6.2) after the growth of EDL933. We next performed a general functional classification of differentially expressed genes using the Comprehensive Microbial Resource [22]. Besides genes with unknown or hypothetical function, differentially expressed genes were mainly identified into the two functional categories “energy metabolism” and “transport and binding of compounds” (Fig. 1). Using the DAVID database (see “Material and Methods”), differentially expressed genes were then classified into GO categories. Thereby, bacterial functions affected by the growth of EDL933 into HMC were precisely identified and the GO category “carbohydrate catabolic process” was the most enriched (EASE = 6.06E-22) (supplementary Table 3). With an emphasis on the

metabolic aspect of the EHEC EDL933 adaptation to HMC, down-regulated genes were involved in glycolysis, in global carbohydrate catabolism as mentioned above, including pentose and lactose metabolism, and in the glycerol metabolic process (supplementary Table 3). Up-regulated genes were involved in the TCA cycle, aromatic compounds catabolism, amino acid transport, and amine catabolic process (supplementary Table 3).

To independently validate the microarray results, the expression of 16 differentially regulated genes was measured by qRT-PCR (Table 1). Fold-change values obtained with microarray hybridizations and qRT-PCR demonstrated a good concordance between the datasets even if fold-change values vary with the two different techniques. As compared to microarray data, qRT-PCR gave a higher fold change for the differential expression of *tnaA*, *mhpB* and *nanA*.

EHEC EDL933 adaptation to HMC involves a catabolic shift from carbohydrates and glycerol to alternative metabolites

An in-depth analysis of the transcriptomic data allowed the identification of the metabolic pathways for which genes were differentially expressed in HMC (Table 1 and Fig. 2). Several genes of the glycolysis pathway, including *pgi*, *pfkB*, *gapA*, *gapC*, *pgk* and *eno*, were significantly down-regulated. Interestingly, several genes involved in metabolic pathways required to catabolize glycolytic substrates were also repressed in HMC. Indeed, genes required for the utilization of carbohydrates such as lactose (*lacZ*), melibiose (*melAB*) and galactarate (*garD*, *garPLRK*) were down-regulated. Genes for glycerol and glycerol-3-P (*glpFK*, *glpTQ* and *glpAB*) degradation were likewise repressed. In addition, several pathways involved in the catabolism of pentose were down-regulated. This included genes for the catabolism of ribose (*rbsDACB*), xylose (*xylFGH*) and arabinose (*araFG*).

In contrast, as part of the adaptation of EDL933 to HMC, genes involved in the TCA cycle were up-regulated (Table 1 and Fig. 2). The TCA cycle provides

reducing equivalents to the bacteria for respiration-mediated ATP synthesis and precursors for multiple biosynthetic pathways. Consistent with this observation, a set of anaplerotic pathways that are catabolic pathways leading to the production of TCA cycle intermediates such as pyruvate, succinate and acetyl-CoA were transcriptionally activated in HMC. These pathways are involved in the degradation of alternative carbon sources such as gluconeogenic substrates including amino acids, amino sugars, fermentation products and small aromatic compounds.

Several amino acid transporter encoding genes were activated in HMC (Table 1 and Fig. 2). The tryptophan utilization pathway was induced since the expression of *tnaB* and *tnaA*, encoding for the tryptophan permease and the tryptophanase were increased 6.3- and 6.6-fold respectively. Tryptophanase transforms tryptophan into pyruvate and indole. Moreover, *pheP* and *livKMF* encoding for the phenylalanine specific transporter and for leucine ABC transporter subunits respectively were activated, suggesting that the bacteria consumes these amino acids.

The adaptation of EDL933 to HMC also occurred by an increased expression of *nanT*, *nanE* and *nanA* required for the transport and the catabolism of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), a predominant amino sugar of the intestinal mucosa [25] (Table 1). NanA is an N-acetylneuraminate lyase catalyzing the formation of pyruvate and N-acetyl-D-mannosamine from Neu5Ac. Finally, we noticed an up-regulation in HMC of several genes involved in the use of secondary metabolites such as *lldP* encoding for the lactate permease, *prpE* and *prpD* involved in propionate catabolism and the *mhp* locus involved in the utilization of phenylpropanoid compounds such as 3-hydroxyphenylpropionic acid (3HPP) and 3-hydroxycinnamic acid (3HCI). Lactate can be converted into pyruvate by lactate dehydrogenase while the catabolism of propionate and phenylpropanoid compounds can produce succinate, pyruvate and acetyl-CoA.

Together these data indicate a pattern of global reorganization of catabolic gene expression in HMC, with especially a down-regulation of glycolysis

associated genes and an up-regulation of genes involved in the TCA cycle and several associated anaplerotic pathways involved in the catabolism of gluconeogenic nutrients.

The HMC is depleted in several carbon sources and ethanolamine

The concentration of several metabolites whose catabolic pathways encoding genes were differentially expressed was measured in HMC and GFC using HPLC-SRM MS. We measured the concentration of lactose and ribose, two compounds whose catabolic pathway is down-regulated and Neu5Ac, lactate, ethanolamine and L-tryptophan whose catabolic pathway is up-regulated. Selected metabolites were detected in GFC at a concentration of 2.98 ± 0.69 mM for lactose, 0.85 ± 0.06 mM for ribose, 8.63 ± 0.65 μ M for Neu5Ac, 0.17 ± 0.01 mM for lactate, 7.9 ± 0.64 μ M for ethanolamine and 0.45 ± 0.02 mM L-tryptophan (Fig. 3). As expected, changes were observed in the abundance of the five metabolites due to the metabolic activity of the human intestinal microbiota. Their amount was significantly reduced in HMC when compared to GFC. The decrease of lactose concentration was the most important with a 14.2-fold reduction, followed by Neu5Ac (3.3-fold), lactate (1.8-fold), ribose (1.5-fold), L-tryptophan (1.5 fold) and ethanolamine that was undetectable. These results suggest that the activity of the human intestinal microbiota limits the availability of several nutrients in the intestinal content such as sugars (lactose and ribose), secondary metabolites (Neu5Ac and lactate), L-tryptophan and ethanolamine that is a nitrogen source for EHEC O157:H7 [8]. We also quantified the metabolites concentrations after the growth of EDL933 to evaluate the consumption of these carbon and/or nitrogen sources under our experimental conditions. As shown in figure 3, the concentration of lactose and ribose was significantly decreased in GFC while in HMC the ribose and L-tryptophan concentration was significantly reduced. L-tryptophan was undetectable in HMC after the growth of EDL933. These data indicate that lactose was catabolised by EDL933 in GFC, L-tryptophan

in HMC and ribose in both media. At the opposite, the concentration of lactate was increased in both GFC and HMC, but less so in the latter, indicating that EDL933 produced lactate during growth (Fig. 3). Finally, before growth of EDL933, the concentration of Neu5Ac and ethanolamine was already low in both GFC and HMC ($8.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$ and $7.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$ respectively); this limited the estimation of their consumption.

EHEC EDL933 growth in HMC leads to down-regulation of T3SS related gene expression

Several genes from the LEE locus were significantly down-regulated in HMC as revealed by microarray and qRT-PCR experiments (Table 1). These include *espA*, *espB* and *espD* encoding for the translocon of the type III secretion system, *espZ* encoding a secreted host cell survival promoting factor, *tir* and *cesT* encoding for the effector protein Tir and its chaperone and *eae* encoding intimin. EHEC O157:H7 possess a set of non-LEE encoded effectors secreted by the T3SS and contributing to virulence [2]. An extensive repertoire of putative and confirmed EHEC O157:H7 type III secreted (T3S) effectors has been established by Tobe *et al.* [2]. Among the 29 confirmed non-LEE effectors encoding genes, 10 were differentially-expressed in HMC and all of them were down-regulated (Table 1).

Several known LEE regulator encoding genes were also found to be down-regulated in HMC (Table 1). This includes several repressors: *hns* encoding for the global AT-rich DNA silencer H-NS [26]; *gadE*, the central regulator of the GDAR system [27]; *psrA*, a prophage-encoded secretion regulator gene [28]; and the post-transcriptional regulator encoding gene *hfq* [29]. Interestingly, the expression of *pchA* and *cra* (*fruR*), encoding for positive regulators of the LEE [30, 31], were down-regulated.

The expression level of some other genes potentially involved in EHEC pathogenesis [32-36] was unchanged following growth of EDL933 in HMC or in

GFC. These include genes encoding the autotransporter EspP, the enterohemolysin HlyA, the adhesins, HcpA, LpfA and YcbQ and genes *qseBC*, *qseEF* and *sdiA* (data not shown).

1.4. Discussion

In this study, the metabolic activity of the human microbiota harbored in the rat intestine was shown to influence EHEC EDL933 metabolism and virulence gene expression *in vitro*. The human intestinal microbial community was maintained in rats for 15 days, a period that preserves the dominant taxonomic bacterial groups of the human gut microbiota as previously shown [13-16]. The gut microbiota is known to induce the maturation of the gastrointestinal tract and to affect the host metabolism, for example by increasing host nutrient intake efficiency through stimulation of host metabolic gene expression [37]. The intestinal microbiota also directly transforms the intestinal milieu by degrading nutrients and producing metabolic wastes [38]. Consequently, intestinal pathogens have to adapt to the metabolic composition of the intestine associated with the presence of the microbiota [3, 5].

The cecal contents of both germ-free rats and rats associated with the human gut microbiota were used as growth media to study EHEC EDL933 transcriptomic adaptation to a mammalian intestinal milieu conditioned by a complex human intestinal microbiota. The transcriptomic adaptation of EDL933 to HMC compared with GFC occurs through an important shift in genes involved in carbon source assimilation pathways. The metabolic profile of EDL933 in HMC together with the lower availability of several carbon sources suggests that it encounters nutrient limitations primarily due to the metabolic activity of the intestinal microbiota. Those conditions are reflected by an important decrease of

the concentration of lactose, ribose, Neu5Ac, lactate, ethanolamine and L-tryptophan in HMC and a metabolic switch from glycolysis to anaplerosis (Table 1 and Fig. 2). Moreover, the lower expression of the GDAR genes in HMC correlates with a lower acidification of the medium after the growth of EDL933. This is consistent with a reduction of several sugar concentrations in HMC such as lactose and a repression of the glycolytic pathway that acidifies the medium by producing organic acids as final by-products. The utilization of lactose and the production of lactic acid by EDL933 in the GFC could contribute to the higher acidification of the medium (Fig. 3).

The lower concentrations of lactose and ribose in HMC suggest that bacterial species of the human intestinal microbiota consume these sugars. Studies have shown that EHEC EDL933 degrades several mucin-associated sugars *in vitro*, including ribose and arabinose in a specific order of preference as compared to the non-pathogenic *E. coli* strain MG1655 [39]. Interestingly, *in vivo* bacterial competition experiments between mutant and wild type EHEC EDL933 strains have shown that catabolic pathways for ribose and arabinose degradation contribute significantly to the colonization of the gut of streptomycin-treated mice [39]. Thus, decreasing the amount of ribose through the metabolic activity of the intestinal microbiota would reduce the colonization of EHEC. Our data show that although the ribose concentration is reduced in HMC and the expression of genes required for its catabolism is lower than in GFC, EHEC EDL933 still consumes it. This suggests that ribose is an available carbon source even in presence of the microbiota. Interestingly, it was shown by Fabich et al. that the inactivation of the ribose utilization pathway inhibits gut colonization of streptomycin treated mice by EHEC EDL933 [39].

While mucin-associated simple sugars have been shown to be important for pathogenic and commensal *E. coli* intestinal colonization, less is known about the role of food-derived sugars. In germ-free mice fed with non-digestible lactose, the

K12 *E. coli* strain MG1655 adapts to the carbohydrate rich diet by inducing an osmotic and oxidative stress response [40]. The high concentration of lactose in GFC is significantly reduced in HMC due to the metabolic activity of the intestinal microbiota. Moreover, lactose was consumed by EDL933 in the GFC but not in the HMC and this correlates with a lower expression of genes required for its degradation in HMC. Taken together, these data highlight the role of intestinal microbiota in limiting the availability of food-derived sugars that can be used by pathogens.

EHEC EDL933 switches toward an anaplerotic metabolism in HMC as shown with the activation of TCA cycle genes and several gluconeogenic catabolic pathways. These results mean that anaplerosis may have a role in the colonization of the intestinal milieu by the pathogen. Anaplerosis allows the utilization of alternative substrates such as gluconeogenic nutrients during deprivation of glycolytic nutrients. Anaplerosis is required for UPEC fitness *in vivo* [41]. Urine provides a nutrient limited environment in which UPEC uses the gluconeogenic pathways to replenish the TCA cycle and produce energy [41]. The importance of gluconeogenesis for EHEC O157:H7 colonization has also been highlighted using streptomycin treated mice as an *in vivo* colonization model for *E. coli*. It has been shown that in the absence of competitors, EHEC EDL933 uses glycolytic rather than gluconeogenic substrates to support an initial rapid growth and maintenance in the gut [9]. However, in competition with commensal *E. coli* that use more efficiently glycolytic substrates, EHEC EDL933 is less competitive and maintains its population by using gluconeogenic nutrients as alternative carbon sources [9].

Identification of alternative carbon substrates used by EHEC O157:H7 in the intestinal milieu is of major importance to understand the colonization potential of the pathogen. Genes involved in the transport and the catabolism of Neu5Ac, amino acids (L-tryptophan, leucine and phenylalanine) and secondary metabolites (lactate, propionate and phenylpropanoid compounds) are activated in

HMC. Neu5Ac is an abundant component of O-glycan in the intestinal mucin [25], while amino acids derived from the proteins and peptides proteolysis by residual pancreatic enzymes [42] and colonic gut microbiota proteases [43]. Metabolic by-products such as lactate, propionate and phenylpropanoids compounds come from the catabolism of carbohydrates and aromatic amino acids respectively [44-46]. Genes required for the catabolism of L-tryptophan were strongly activated in HMC as compared to GFC and this correlated with a high decrease of the L-tryptophan concentration after the growth of EDL933 in HMC while in GFC it was not changed (Table 1 and Fig. 3). Therefore, L-tryptophan is an alternative nutrient consumed by EDL933 in the intestinal content conditioned by the human microbiota. Although genes required for their catabolism are activated, Neu5Ac and are present in HMC at a concentration lower than in GFC. This suggests that in HMC EHEC EDL933 retunes its metabolic activity according to low amount of some sugars such as lactose and ribose, and the presence of secondary carbon substrates to produce energy even if their concentration is reduced in HMC. The activation of *nanA* encoding an N-acetylneuraminate lyase has been observed during the growth of EDL933 on cecal mucus [39]. A *nanA* deletion impairs the intestinal colonization of *E. coli* MG1655 but when using streptomycin treated mice, does not affect the colonization abilities of EHEC EDL933 [39]. Bertin *et al.* have shown that *nanA* is induced and that Neu5Ac catabolism confers a high competitive growth advantage to EDL933 in the bovine small intestine content [7]. These two studies show an activation of *nanA* in different intestinal contents and highlight the niche-dependent role of Neu5Ac for the pathogen. Our results suggest that EHEC EDL933 expresses *nanA* to adapt the intestinal milieu conditioned by the microbiota. In other pathogens such as *Salmonella* serovar Typhimurium and *Clostridium difficile*, the importance of Neu5Ac catabolism was demonstrated in the context of an antibiotic-disrupted microbiota [47]. The catabolic genes of lactate were activated indicating its use as a secondary carbon source. Interestingly, lactate was also produced by EHEC EDL933 in HMC making more difficult the interpretation of the activation of the catabolic genes.

The adaptation of EDL933 to HMC also occurs through the activation of the catabolic pathways required for the utilization of fermentation products including propionate and phenylpropanoids compounds. The utilization of such compounds as alternative gluconeogenic carbon sources could play an important role during the colonization of the intestine by EHEC EDL933 by ensuring energy supply. Since gluconeogenic substrates are known to help EDL933 intestinal colonization in the presence of a complex intestinal microbiota, as well as its maintenance in the bovine intestinal content [9, 24], further investigations on the role of these catabolic pathways are of interest.

Together, our results suggest that EHEC EDL933 encounters starvation in the cecal content of the human gut microbiota associated rats and, in response to these environmental conditions, tunes up the expression level of genes involved in several catabolic pathways to drive an efficient adaptation. Notably, EHEC EDL933 still consumes ribose in HMC and activates the catabolism of L-tryptophan, which is part of its adaptation to the metabolic activity of the human microbiota.

The metabolic activity of the human intestinal microbiota also resulted in a down-regulation of EHEC EDL933 virulence genes that are directly involved in the formation of AE lesions. Indeed, the expression of several genes belonging to the LEE pathogenicity island as well as many of the known non-LEE effectors encoding genes is reduced in HMC. These results suggest that the human microbiota induced changes in the composition of the intestinal contents of rats resulting in a specific down-regulation of AE genes of EHEC EDL933. A wide range of host- or microbiota-released compounds including hormones, autoinducers, waste products and carbon sources can influence the expression of virulence genes of EHEC [14, 30, 31, 48, 49]. Ethanolamine in concentrations that cannot promote growth of EHEC O157:H7 as a nitrogen source [8] has been

shown to activate the expression virulence genes including AE associated genes [49]. In our study, ethanolamine was quantified at a concentration of 7.9 μM in GFC but was not detected from HMC. Moreover, the lower concentration of L-tryptophan in the HMC after the growth of EHEC EDL933 indicates an important activity of the tryptophanase encoded by *tnaA* that converts L-tryptophan into indole, ammonia, and pyruvate. Indole is a metabolite that is involved in several bacterial processes important for pathogenesis of EHEC. These include motility, biofilm formation and production of Shiga toxin and LEE gene expression [50]. Together, these results indicate that the microbiota modulates the concentration of molecules in the gut, some of them being a signal that may influence the expression of EHEC O157:H7 virulence genes.

In this study, we describe the transcriptomic adaptations of EHEC EDL933 grown *in vitro* in the cecal content of human intestinal microbiota-associated rats. Notably, we have shown that the metabolic activity of the intestinal microbiota results in decreased concentration of several carbon sources potentially important for EDL933 colonization of the intestine. In response to these changes induced by the human gut microbiota, EHEC EDL933 switches to anaplerotic metabolism with the activation of several genes required for the utilization of alternative substrates. Among these, the activation of the L-tryptophan catabolic pathway allowed EHEC EDL933 to use L-tryptophan as carbon and nitrogen sources in response to the metabolic activity of the human microbiota. Moreover, the expression profile of virulence genes indicates a down-regulation of genes involved in AE lesions. This global approach increases our understanding of the impact of a complex intestinal microbiota on EHEC at the transcriptional level. Deciphering the interplay between EHEC and the gut microbiota may contribute to the development of novel preventive or therapeutic strategies aiming at modulating the population level of protective human gut symbionts.

1.5. Experimental procedures

Ethics statement

All procedures were carried out according to the European directives on the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU, and the laboratory is bound to the guidelines of the local ethics committee CEMEAA 02. The protocol (registered number CE 120-02) was approved by the local ethics committee CEMEA Auvergne.

Fecal sample processing

Fecal samples from a healthy adult volunteer were used in this study. The subject consumed a standard Western diet, did not receive antibiotics during the three months preceding the study and had not previous diagnosed gastrointestinal disease. Freshly voided feces were stored at 4°C under anaerobic conditions and processed within 12 h. One gram of collected fecal sample was diluted 10-fold (wet weight/volume) in an anaerobic mineral solution containing 5 g/liter NaCl, 2 g/liter glucose and 0.3 g/liter cysteine-HCl.

Germ-free rats and human gut microbiota transplantation

A validated model of germ-free rats transplanted by a human gut microbiota was used as previously described [13-16]. Briefly, ten germ-free adult male Fisher 344 rats, without impaired functions and provided by the breeding facilities of the Anaxem platform of INRA (Micalis Unit, Jouy-en-Josas, France) were kept in germ-free isolators with controlled light, temperature and humidity and fed with sterilized food and water. To reproduce the diversity of a human-type diet, the food contained lipids and proteins of animal and plant origins, sucrose

and cooked starch. The ten rats were randomly separated into 2 groups of 5 individuals.

Human fecal microbiota transplantation in rat intestines was performed as previously described [14-16]. A first group was inoculated with 1 mL of a fresh dilution (10⁻³) of a fecal microbiota from a healthy volunteer and a second was inoculated with 1 mL of anaerobic mineral solution and used as reference. Rats were bred for two weeks and were sacrificed by CO₂ inhalation. The cecal contents from each group were harvested, pooled and centrifuged for 30 min at 7000 g. Supernatants were sterilized by filtration (0.2 µm), filtrates were half diluted in a mineral solution and glucose was added to a final concentration of 0.2%; pH was adjusted to 7 by the addition of 10 N NaOH. The *in vitro* human microbiota associated rat's cecal contents or germ-free rat's cecal contents, named HMC and GFC respectively, were used as growth media for the EHEC strain EDL933.

Bacterial growth conditions

Wild-type EHEC O157:H7 strain EDL933, isolated from contaminated hamburger meat was used in this study [17]. EHEC EDL933 was cultured overnight in LB medium. Bacteria were then washed with PBS, diluted to a final optical density at 600 nm of 0.01 in GFC or in HMC and incubated without aeration at 37°C for ten hours. *E. coli* EDL933 was grown in three independent biological replicates in freshly harvested GFC and HMC. Growth was monitored by enumeration on LB plates and bacterial pellets were conserved at -80°C for subsequent RNA extractions. Similar bacterial counts were obtained in both media at the harvesting time (supplementary Fig. 1).

RNA extraction, Microarray Experiments and qRT-PCR

RNA extractions were performed using RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion), according to manufacturer's recommendations. After a DNase treatment, the absence of residual DNA in RNA samples was controlled by PCR using primers targeting the housekeeping gene *tufA*. cDNA synthesis and microarray experiments were performed as previously described [18]. Briefly, ten µg of RNAs were converted into cDNA using reverse transcriptase and random hexanucleotide primers. Remaining RNAs were eliminated by RNase A treatment. For microarray experiments, one µg of fragmented and biotinylated cDNAs was hybridized onto Affymetrix Gene-Chip® *E. coli* Genome 2.0. Expression levels were analysed using the FlexArray software [19]. Data were normalized using the robust multi-array average algorithm (RMA) procedure [20] and expression levels obtained from 3 biological replicates of each experimental condition were compared using the EB (Wright and Simon) algorithm. Selection of differentially-expressed genes was based on a 1.5-fold-change cut-off and a p-value<0.05. Normalized microarray data are show in supplementary Table 1. Microarray results were validated by qRT-PCR as previously described [21]. The copy number of each transcript was evaluated in 50 ng of each cDNA sample using a standard curve. The standard curve was generated by amplification of serial diluted template amplicons using primer sets used in qRT-PCR reactions (supplementary Table 2). The amplicons, corresponding to genes of interest, were amplified from EDL933 genomic DNA using specific primers (supplementary Table 2). Since its expression was stable in each growth condition, the housekeeping gene *tufA* was used to normalize gene expression values. Normalized results that are the ratios between the cDNA copy number of the gene of interest and the cDNA copy number of *tufA* were used to calculate qRT-PCR-derived fold changes presented in Table 1. The results are the mean of three independent biological replicates. A functional classification was performed according to the Comprehensive Microbial Resource (CMR) [22]. Differentially expressed genes were categorized in Gene Ontology (GO) categories using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [23],

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>, as previously described [24]. For each gene list clustered in the different GO terms, DAVID calculated an “Expression Analysis Systematic Explorer” (EASE) score (also called enrichment score) corresponding to a modified Fisher Exact P-value (ranged from 0 to 1). Fisher Exact P-value = 0 represents perfect enrichment. P-value smaller than 0.05 considered as strongly enriched in the annotation categories was used as standard cut-off level.

Metabolite concentration measurement

The concentrations of lactose, ribose, lactate, Neu5Ac, ethanolamine and L-tryptophan were determined using a High-Performance Liquid Chromatography–Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry (HPLC-SRM MS) assay. Briefly, 50 μ L of matrix samples (i.e. GFC and HMC) were mixed with 500 μ L of internal standard solution (100 μ M of stable isotope labeled products of lactose, ribose, lactate, Neu5Ac, ethanolamine and L-tryptophan). The samples were vortexed and centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial.

Ten μ L of samples were injected with a Perkin Elmer Series 200 HPLC (Shelton, CT) onto a Thermo Biobasic C18 5 x 1 mm column (5 μ m) with a flow rate of 100 μ L/min. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and 20 mM ammonium acetate aqueous solution (pH \approx 7.0) at ratio of 50:50. The AB SCIEX API 2000 QTRAP mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) interfaced with the HPLC system used a pneumatic assisted electrospray ion source operating in negative and positive ion mode. The selected reaction monitoring (SRM) transitions were set to m/z 341 \rightarrow 89 (lactose; negative mode), 347 \rightarrow 92 (13C6-lactose; negative mode), 149 \rightarrow 59 (ribose; negative mode), 154 \rightarrow 61 (13C5-ribose; negative mode), 89 \rightarrow 43 (lactate, negative mode), 92 \rightarrow 45 (2H3-lactate; negative mode), 308 \rightarrow 87 (Neu5Ac; negative mode), 311 \rightarrow 90 (2H3-Neu5Ac; negative mode), 62 \rightarrow 44 (ethanolamine; positive mode), 66 \rightarrow 48

(2H4-ethanolamine), 205 → 146 (L-tryptophan; positive mode) and 208 → 147 (2H3-L-tryptophan, positive mode). The dwell time was set to 100 msec and the pause time at 5 msec. Measured ratios of the light- and heavy-isotopic pairs were used for quantification.

Microarray accession number

Microarray data are available at the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> under the accession number GSE37095.

1.6. Acknowledgments

We thank A. Durand, A. Garrivier and C. Del'Homme for their technical assistance with harvesting and filtering cecal contents and Christophe Chassard and Yolande Bertin for critical reading of the manuscript. We are grateful to Michal Blazejczyk from the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montreal, Canada) for his help in the analysis of the microarray data and Judith Kashul, for editing the manuscript.

G.L.B. was supported by a scholarship from the Institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal -Fonds de recherche du Québec - santé (Project 40148). This work was also supported in part by the 61st session de la Commission permanente de coopération franco-québécoise (Project 61. 116 to CM and JH), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Strategic and Discovery Grants to JH, RGPIN STP 307430 and SD-25120-09, respectively) and by EADGENE, N° FOOD-CT-2004-506416,

Network of Excellence under the 6th Research Framework Program of the European Union (CM).

1.7. References

- [1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol 2004;2:123–40.
- [2] Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, *et al.* An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination, Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1494–6.
- [3] Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine, PLoS One 2013;8:e53957.
- [4] Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection, J Physiol 2009;587:4159–67.
- [5] Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, *et al.* Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota, Science 2012;336:1325–9.
- [6] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, *et al.* A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis, Science 2003;299:2074–6.
- [7] Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, *et al.* Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content, Environ Microbiol 2013;15:610–22.

- [8] Bertin Y, Girardeau JP, Chaucheyras-Durand F, Lyan B, Pujos-Guillot E, Harel J, *et al.* Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content, *Environ Microbiol* 2011;13:365–77.
- [9] Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, Allen JH, *et al.* Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine, *Infect Immun* 2004;72:1666–76.
- [10] Barnett Foster D. Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract, *Virulence* 2013;4:315–23.
- [11] Hernandez-Doria JD, Sperandio V, Nutrient and chemical sensing by intestinal pathogens, *Microbes Infect* 2013;15:759–64.
- [12] Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E, *et al.* Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome, *Sci Rep* 2012;2:233.
- [13] Alpert C, Sczesny S, Gruhl B, Blaut M. Long-term stability of the human gut microbiota in two different rat strains, *Curr Issues Mol Biol* 2008;10:17–24.
- [14] de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C. Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect Immun* 2009;77:783–90.
- [15] Crouzet L, Gaultier E, Del'Homme C, Cartier C, Delmas E, Dapoigny M, *et al.* The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota, *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e272–82.
- [16] Dostal A, Lacroix C, Pham VT, Zimmermann MB, Del'homme C, Bernalier-Donadille A, *et al.* Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats, *Br J Nutr* 2014;111:2135–45.
- [17] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *N Engl J Med* 1983;308:681–5.

- [18] Chekabab SM, Jubelin G, Dozois CM, Harel J. PhoB activates *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation, PLoS One 2014;9:e94285.
- [19] Blazejczyk M MM, Robert N. FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays., 2007;<http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray/>.
- [20] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias, Bioinformatics 2003;19:185–93.
- [21] Branchu P, Matrat S, Vareille M, Garrivier A, Durand A, Crepin S, *et al.* NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide, PLoS Pathog 2014;10:e1003874.
- [22] Davidsen T, Beck E, Ganapathy A, Montgomery R, Zafar N, Yang Q, *et al.* The comprehensive microbial resource, Nucleic Acids Res 38 2010;38:D340–5.
- [23] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, Nat Protoc 2009;4:44–57.
- [24] Bertin Y, Deval C, de la Foye A, Masson L, Gannon V, Harel J, *et al.* The Gluconeogenesis Pathway Is Involved in Maintenance of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine Intestinal Content, PLoS One 2014;9:e98367.
- [25] Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract, Biochem J 2004;384:307–16.
- [26] Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli* : Ler antagonizes H-NS-dependent repression, Mol Microbiol 2001;39:664–78.
- [27] Kailasan Vanaja S, Bergholz TM, Whittam TS. Characterization of the *Escherichia coli* O157:H7 Sakai GadE regulon, J Bacteriol 2009;191:1868–77.

- [28] Tree JJ, Roe AJ, Flockhart A, McAteer SP, Xu X, Shaw D, *et al.* Transcriptional regulators of the GAD acid stress island are carried by effector protein-encoding prophages and indirectly control type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Mol Microbiol* 2011;80:1349–65.
- [29] Hansen AM, Kaper JB. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 2009;73:446–65.
- [30] Njoroge JW, Nguyen Y, Curtis MM, Moreira CG, Sperandio V. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *MBio* 2012;3:e00280–12.
- [31] Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Microbiology* 2009;155:521–30.
- [32] Lloyd SJ, Ritchie JM, Torres AG. Fimbriation and curliation in *Escherichia coli* O157:H7: a paradigm of intestinal and environmental colonization, *Gut Microbes* 2012;3:272–6.
- [33] Menestrina G, Moser C, Pellet S, Welch R. Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family, *Toxicology* 1994;87:249–67.
- [34] Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldana Z, Jordan D, Tarr PI, Kaper JB, *et al.* The *Escherichia coli* *ycbQRST* operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7, *Environ Microbiol* 2009;11:1815–26.
- [35] Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, *et al.* Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J Clin Invest* 2007;117:3519–29.
- [36] Brunder W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V, *Mol Microbiol* 1997;24:767–78.

- [37] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine, *Science* 2001;291:881–4.
- [38] Shin R, Suzuki M, Morishita Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J Med Microbiol* 2002;51:201–6.
- [39] Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, *et al.* Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine, *Infect Immun* 2008;76:1143–52.
- [40] Rothe M, Alpert C, Engst W, Musiol S, Loh G, Blaut M. Impact of nutritional factors on the proteome of intestinal *Escherichia coli* : induction of OxyR-dependent proteins AhpF and Dps by a lactose-rich diet, *Appl Environ Microbiol* 2012;78:3580-91.
- [41] Alteri CJ, Smith SN, Mobley HL. Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle, *PLoS Pathog* 2009;5:e1000448.
- [42] Genell S, Gustafsson BE, Ohlsson K. Quantitation of active pancreatic endopeptidases in the intestinal contents of germfree and conventional rats, *Scand J Gastroenterol* 1976;11:757–62.
- [43] Gustafsson BE. The physiological importance of the colonic microflora, *Scand J Gastroenterol Suppl* 1982;77:117–31.
- [44] Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism, *J Appl Bacteriol* 1996;81:288–302.
- [45] Diaz E, Ferrandez A, Prieto MA, Garcia JL. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli* , *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:523-69.
- [46] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production, *Proc Nutr Soc* 2003;62:67–72.

- [47] Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, *et al.* Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens, *Nature* 2013;502:96–9.
- [48] Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, *et al.* Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization, *Nature* 2012;492:113–7.
- [49] Kendall MM, Gruber CC, Parker CT, Sperandio V. Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *MBio* 2012;3:00050–12.
- [50] Bommarius B, Anyanful A, Izrayelit Y, Bhatt S, Cartwright E, Wang W, *et al.* A family of indoles regulate virulence and Shiga toxin production in pathogenic *E. coli*, *PLoS One* 2013;8: e54456.

1.8. Legends

Figure 1. Functional classification of differentially expressed genes in HMC as compared to GFC. Black columns represent down-regulated transcripts; white columns are up-regulated transcripts in HMC.

Figure 2. Schematic representation of the metabolic adaptation of *E. coli* EDL933 in HMC. Significant (p value < 0.05) differentially expressed genes and operons identified by microarrays and involved in the central metabolism and in catabolic pathways are shown. Up-regulated genes in HMC versus GFC are represented in red and down-regulated genes are shown in blue. Three independent biological replicates were performed. 3HPP: 3-hydroxyphenylpropionic acid; 3HCl: 3-hydroxycinnamic acid.

Figure 3. Concentrations of lactose, ribose, Neu5Ac, lactate, ethanolamine and L-tryptophan in GFC and HMC as measured by HPLC-SRM MS. Measures were performed in triplicate before and after the growth of EDL933 in GFC and in HMC. The results shown are the means and standard errors from at least three independent experiments. An unpaired two-tailed Student's t-test was performed to calculate p values. *** indicates $p < 0.001$; * indicates $p < 0.05$

Tables

Table 1. Microarray and qRT-PCR data representing EHEC EDL933 significantly differentially expressed genes in HMC. ND = Not Detected

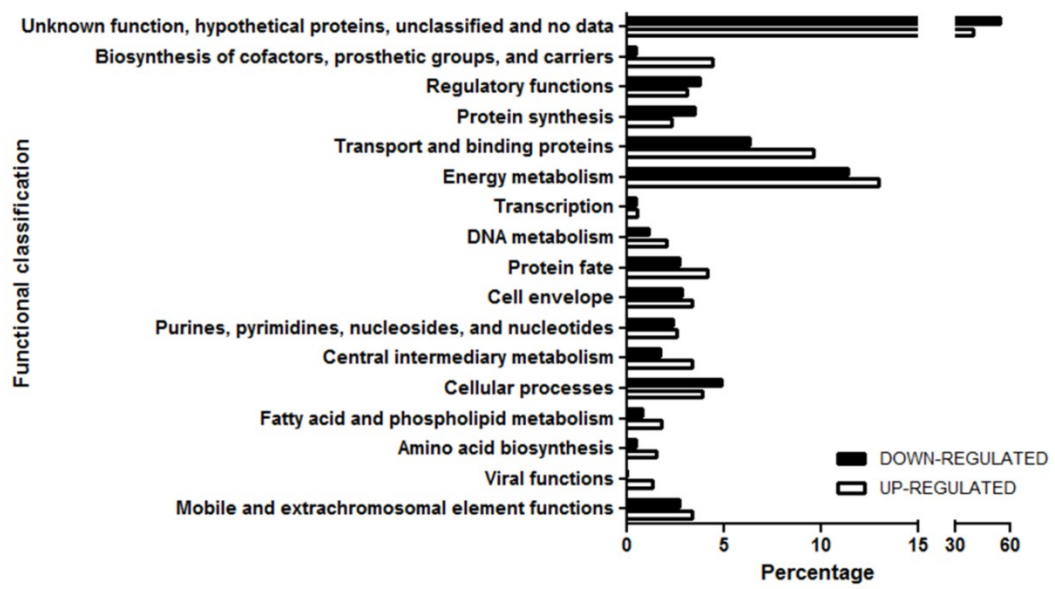


Figure 1

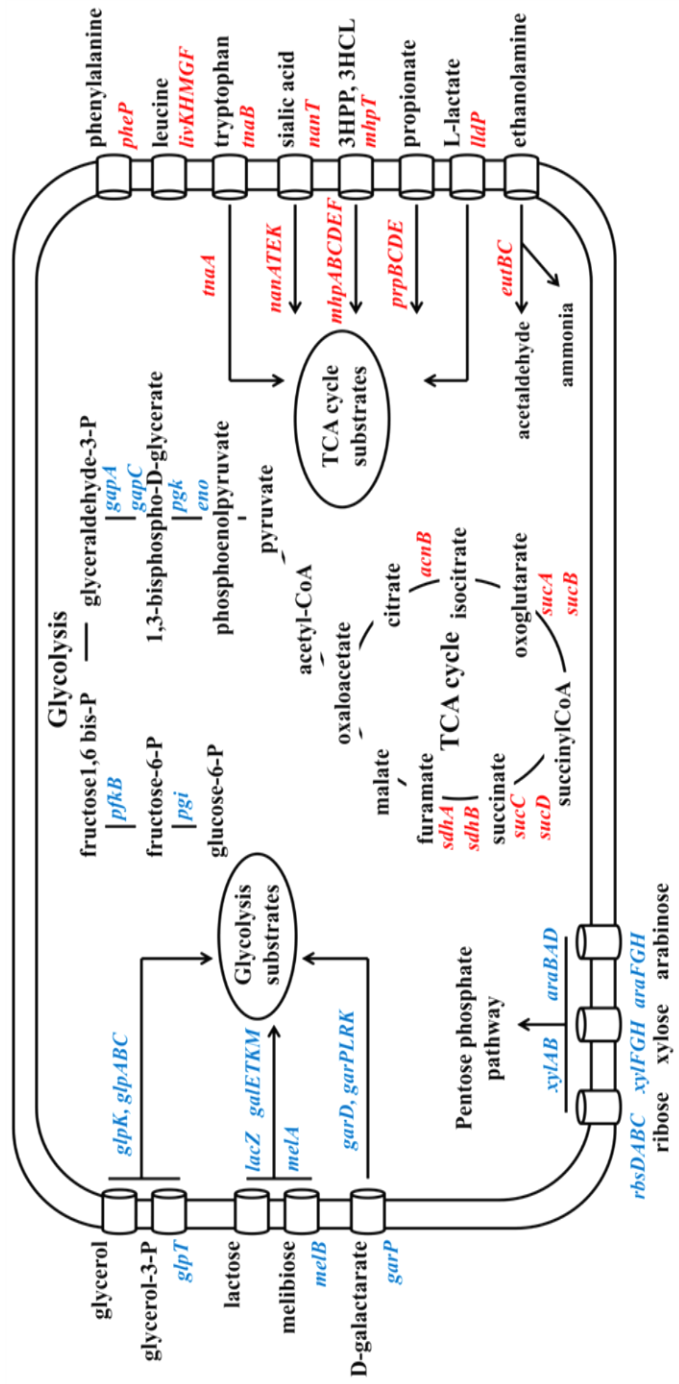


Figure 2

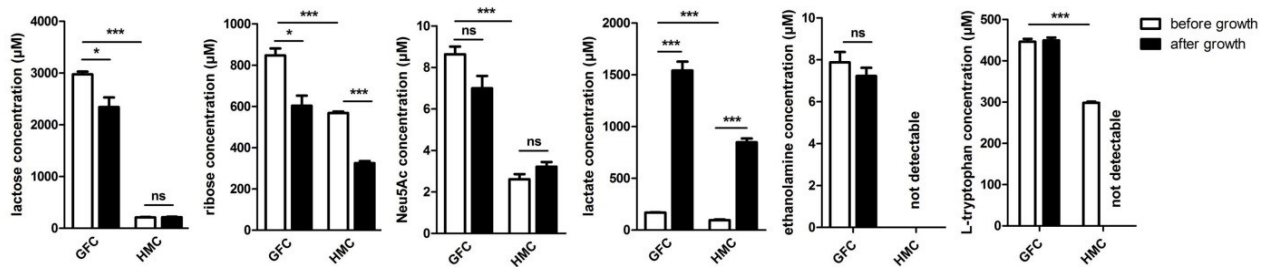


Figure 3

Genes	Chip label	Encoded function	FC array	p value	FC qPCR	p value
GDAR genes						
<i>gadB</i>	b3517	glutamate decarboxylase	-265.5	<0.001		
<i>gadA</i>	b1493	glutamate decarboxylase	-130.2	<0.001	-126.2	<0.001
<i>hdeA</i>	b3510	acid-resistance protein	-44.4	<0.001		
<i>hdeB</i>	b3509	acid stress chaperone	-36.2	<0.001		
<i>gadC</i>	b1492	glutamate/ γ -aminobutyric acid transporter	-30.6	<0.001		
<i>gadE (yhiE)</i>	b3512	DNA-binding transcriptional regulator	-28.8	<0.001		
<i>hdeD</i>	b3511	acid-resistance membrane protein	-17.7	<0.001		
<i>gadX</i>	b3516	DNA-binding transcriptional regulator	-10.9	<0.001	-47.9	0.009
<i>gadW (yhiW)</i>	b3515	DNA-binding transcriptional dual regulator	-8.4	<0.001		
Glycolysis						
<i>pgi</i>	b4025	glucose-6-phosphate isomerase	-2.2	0.001		
<i>pfkB</i>	b1723	6-phosphofructokinase II	-3.6	<0.001		
<i>gapA</i>	b1779	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-6.2	<0.001		
<i>gapC</i>	b1417	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2.1	0.001		
<i>pgk</i>	b2926	phosphoglycerate kinase	-1.8	0.032		
<i>eno</i>	b2779	phosphopyruvate hydratase	-2.1	0.001		
TCA cycle						
<i>acnB</i>	z0128	bifunctional aconitate hydratase 2	2.1	0.048		
<i>sucABCD</i>	b0726	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	3.5	<0.001		
<i>sdhCDA</i>	b0723	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	3.3	0.003		
Transport and catabolism						
<i>glpTO</i>	z3498	sn-glycerol-3-phosphate transporter	-8.4	<0.001	-3.3	0.038
<i>glpFKX</i>	b3927	glycerol facilitator protein	-11.8	<0.001		
<i>glpABC</i>	c2782	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit	-3.2	<0.001		
<i>lacZYA</i>	z0440	beta-D-galactosidase	-11.3	<0.001	-3.2	0.022
<i>galETKM</i>	b0758	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	-4.0	<0.001		
<i>melAB</i>	b4119	alpha-galactosidase	-15.0	<0.001		
<i>garD</i>	b3128	galactarate dehydratase	-4.3	0.002		
<i>garPLRK</i>	b3127	galactarate facilitator protein	-16.4	0.001		
<i>rbsDACBKR</i>	b3751	D-ribose pyranase	-9.0	<0.001	-6.0	0.020
<i>xylFGHR</i>	b3566	D-xylose transporter subunit	-13.8	<0.001		
<i>xylAB</i>	b3565	xylose isomerase	-9.2	<0.001		
<i>araFGH</i>	b1901	L-arabinose-binding periplasmic protein	-2.5	0.006		
<i>araBAD</i>	b0063	L-arabinose transporter ATP-binding protein	-1.8	0.034	-3.4	0.028
<i>tnaCAB</i>	b3708	tryptophanase	6.6	<0.001	24.5	0.004
<i>pheP</i>	z0715	phenylalanine transporter	2.1	0.024		
<i>livKHMGF</i>	c4248	leucine-specific binding protein precursor	1.6	<0.001		
<i>mhpABCDFE</i>	b0348	3-(3-hydroxyphenyl)propionate hydroxylase	2.3	0.001	29.2	0.014
<i>lldPRD</i>	b3603	L-lactate permease	1.7	0.027	6.4	0.037
<i>prpBCDE</i>	b0335	propionyl-CoA synthetase with ATPase domain	2.2	<0.001		

<i>nanATEK-yhcH</i>	b3225	N-acetylneuraminate lyase	2.5	<0.001	17.1	0.049
<i>euBCLKR</i>	b2441	ethanolamine ammonia-lyase heavy chain	2.1	0.006		
Virulence genes						
<i>espZ</i> (LEE2)	z5122	translocated effector protein	-1.9	<0.001	-2.2	0,018
<i>cesT</i> (LEE5)	z5111	Tir-specific chaperone	-1.7	0.023		
<i>espA</i> (LEE4)	z5107	T3SS translocon subunit	-1.5	0.024	-2.9	0,023
<i>espD</i> (LEE4)	z5106	T3SS translocon subunit	-2.1	0.001		
<i>espB</i> (LEE4)	z5105	pore forming T3S effector protein	ND		-6.3	0,026
<i>tir</i> (LEE5)	z5112	T3S effector protein, intimin receptor	ND		-4.4	0,003
<i>eae</i> (LEE5)	z5110	intimin (adhesin)	ND		-2.5	0,007
<i>espJ</i> (Z3071)	z3071	T3S effector protein	-2.1	0.028	-2.4	0,036
<i>espM2</i> (Z3918)	z3918	T3S effector protein	-23.5	<0.001	-2.2	<0,001
<i>nleG</i> (Z6010)	z6010	T3S effector protein	-2.3	0.003	-2.4	0,042
<i>nleA</i> (Z6024)	z6024	T3S effector protein	-2.9	<0.001	-5.7	0,027
<i>espK</i>	z1829	T3S effector protein	-2.5	0.010		
<i>espM1</i>	z2565	T3S effector protein	-1.6	0.038		
<i>nleG8-2</i>	z3919	T3S effector protein	-3.0	0.001		
<i>espW</i>	z3920	T3S effector protein	-2.0	0.006		
<i>espL2</i>	z4326	T3S effector protein	-2.2	0.014		
<i>nleH2</i>	z6021	T3S effector protein	-1.9	0.030		
Virulence regulator encoding genes						
<i>pchA</i>	ECs10 91	activator	-4.9	<0.001		
<i>cra</i> (<i>fruR</i>)	b0080	activator	-3.3	<0.001		
<i>psrA</i>	z1789	repressor	-3.6	<0.001		
<i>hns</i>	b1237	silencer	-1.8	0.010		
<i>gadE</i>	b3512	repressor	-28.8	<0.001		
<i>hfq</i>	b4172	repressor	-2.0	0.005		

Table 1

1.9. Supporting information

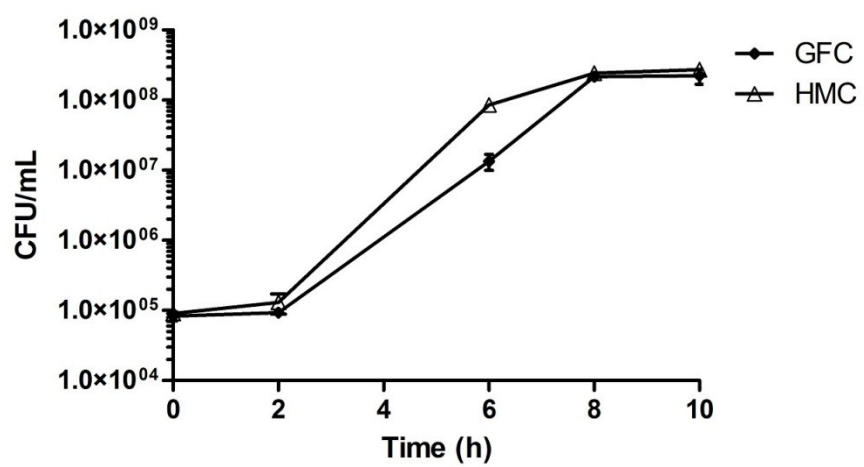
Supplementary Figure 1. *In vitro* E. coli EDL933 growth in GFC and HMC.

The results shown are the means and standard errors from three independent experiments.

Supplementary Table 1. List of primers used in the qRT-PCR experiments

Supplementary Table 2. Normalized microarray data. A complete list of significant differentially expressed genes is presented and sorted relative to the fold change.

Supplementary Table 3. GO categories of differentially expressed genes involved in the central metabolism and the catabolism of carbon and nitrogen sources, and their respective enrichment scores as calculated by DAVID. An enrichment score smaller than 0.05 is considered as strongly enriched.



Supplementary Figure 1

Genes			Product size	Tm		Product Size	Tm
<i>tufA</i>	Forward	GGCTTCTTGGATTCTACAT	652bp	55.81	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	165bp	54.92
	Reverse	CAAATGATGCCCTTTTAGTG		55.84	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG		54.89
<i>ler</i>	Forward	CAACAAGTCCATACATTACAGC	392bp	55.76	AGTTCTACAGCAGGAAGCAA	174bp	55.36
	Reverse	TTTCATCTTCCAGCTCAGTT		55.07	TTGCGGTAGTAAACACCTTT		55.09
<i>sepZ</i>	Forward	CTGCAGGCTCTGAAGTAAGT	416bp	54.93	ATGGAAGCAGCAAATTTAAG	162bp	54.83
	Reverse	CCAGGGCTAAGTATTCTGTG		55.01	AGCCGTAGTGGTAAGTGCTA		55.27
<i>escV</i>	Forward	TCTGTATTGTCTGTCCGGTGA	445bp	55.00	AGAAAACCTTGCAGGTGATA	197bp	54.96
	Reverse	TTTCCTCAAAGAAATCCAA		55.00	CCTTATTATTGCCAGTTCCA		55.35
<i>tir</i>	Forward	ACACCACAGAAACTCAGACC	419bp	54.98	TACAGGTCTGATAGGGTTGG	168bp	55.08
	Reverse	GCGTTTAGCTTGTGTTCAT		55.64	TTTGATTATCTGGGTTCTGG		55.15
<i>eae</i>	Forward	TGAACACAGTACGCAGAAGA	615bp	55.46	GTTCTGTGCAATGGTCAAGT	175bp	55.09
	Reverse	GCAGTTGTCTTATCAGCCTTA		54.90	TTGCAGTTCCTGAAACAATA		54.41
<i>espA</i>	Forward	AATGTGAGTGCAGTTCTTC	448bp	55.44	ATATGTGCAAGGATGAGGTG	171bp	54.98
	Reverse	TTTCGAGCTGGCTATTATTC		54.91	AGATTAGCCATCTTTTGTGC		54.63
<i>espB</i>	Forward	TTGAGAGCCAGAATAAAGC	439bp	54.93	AGGTTGCAAATAAAGCTCTG	169bp	54.89
	Reverse	CAACAAATGCTGTGGTATTG		55.08	GCAAGATCTTCAGCAAAGTC		55.23
<i>espJ</i>	Forward	TCCAGAAAATACTCCTCCAA	418bp	54.85	AAACGAGATTTTGTGCTGT	191bp	55.03
	Reverse	TAGAAGAGAGCCGACAGAAG		54.99	GCATTTCTGTGCTCTCTTT		54.82
<i>espM2</i>	Forward	GGAAGAATGATGAGGTCGTA	440bp	55.12	GCAAAAATTTCCACTGAAGA	160bp	55.51
	Reverse	CGAATCGATATGTTTCTGGT		55.17	TCATACCATCACAAAGAGCA		55.11
<i>nleG</i>	Forward	CCCTTGATTATTTGCAGAAG	512bp	55.07	TGGGCTAATAGCTATGATTTG	177bp	54.83
	Reverse	GCGTAGCCTTTTTAGATTCA		54.99	ATGCAATGTAGATGGCTTTAC		54.55
<i>nleA</i>	Forward	CCATTACAGGCAACTCTAGG	471bp	55.01	AAATATGCCGTTCTTACCAA	188bp	54.95
	Reverse	ATCGATTACCACATCCTCTG		54.98	GCCCACCATAAAAATAGTGTC		54.59
<i>tnaA</i>	Forward	ATGGTGGCGTTCTCTAACTA	497bp	54.99	ATAACGTGCCGTATATCGTT	195bp	54.85
	Reverse	TCGGTGTACACATCAAAGAA		55.02	CGATGGTCCAGTCTTTGTAT		55.07

<i>mhpB</i>	Forward	GATCTTGCCGTTTCTTACTG	506bp	55.12	GTTTCACCAGCACTCTCAAT	199bp	55.26
	Reverse	ATTCATGTGTGCGACTTTCC		55.02	TCCTCAACAAACTTCTCAGC		55.58
<i>nana</i>	Forward	CTTTGATCAACAACAAGCA	581bp	54.91	TATCGGGCAATTATTGATTC	158bp	55.20
	Reverse	ACTACCGATACCACCATCAG		54.94	ATCTGATAGAGATCGCCAGA		54.93
<i>lacZ</i>	Forward	ACTAGGTCTGAACGTGAAAA	570bp	55.02	GGATTGAAAATGGTCTGCT	151bp	55.09
	Reverse	GGATCGACAGATTTAATCCA		55.05	GCGTTAAAGTTGTTCTGCTT		54.96
<i>rbsB</i>	Forward	AGAAAGAGGCGGATAAACTT	460bp	54.90	GCCACATTGCTTCTGATAAC	182bp	55.83
	Reverse	AACAGGTTCTGCATTACGTT		54.90	GCTGGCAAGAACATTAAACT		54.71
<i>araF</i>	Forward	CCGGAAAAACAAATTTATCA	427bp	55.33	GGTATCGGTATTAACGGTGT	169bp	54.09
	Reverse	ACTTACCGCCTAACCTTTT		54.88	TAACTTCGGTGAATTTGGTC		55.22
<i>glpT</i>	Forward	CGGTGATGTTTGTACTGTTG	545bp	54.98	AATGATTATCCGGACGACTA	168bp	54.68
	Reverse	ACCCGCATACTCATAGAAGA		54.91	CAGATAAGTCGGTGACCAGT		55.14
<i>lldP</i>	Forward	GCTTCTTCTATGGTTTGTGG	510bp	54.96	ACATCATTCGCTCGTCTATT	193bp	54.90
	Reverse	AGCTAAGTACTGAGCGATG		54.90	GTGTTAACAATCAGGCACAG		54.13
<i>gadA</i>	Forward	GTACTIONCGCCATCAACTTC	409bp	54.95	AGGTGATTGCGCAGTATTAT	192bp	54.95
	Reverse	TATTCAGGGAGGCTTTGTA		54.98	CTTACCCTCTTTCAGTTTG		55.00
<i>gadX</i>	Forward	AGCATTAATCTTTGCGTTGT	457bp	55.16	GATCACTTTATACCGCTGCT	166bp	54.66
	Reverse	ACAGTCAGTGCCGTA AAAAT		54.90	TCTCTTCTTCGCGTAAATTTT		54.55

Supplementary Table 1

Supplementary Table 2. Available at :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457914002159>

	GO category	Number of genes	Enrichment score
Repressed	central metabolism		
	glycolysis	13	1.98E-06
	carbon sources		
	carbohydrate catabolic process	57	6.06E-22
	glycerol metabolic process	6	3.54E-03
	beta-galactosidase complex	2	4.61E-02
	glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity	4	3.33E-04
pentose metabolic process	6	4.46E-02	
Induced	central metabolism		
	tricarboxylic acid cycle	7	1.43E-03
	carbon/nitrogen sources		
	aromatic compound catabolic process	8	5.30E-06
	amino acid transport	10	2.44E-02
amine catabolic process	8	2.32E-02	

Supplementary Table 3

Implication de l'auteur dans cet article

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué la majorité des expérimentations, j'ai analysé les résultats et j'ai écrit le manuscrit. L'inoculation des rats avec *B. thetaiotaomicron*, l'euthanasie des animaux et la récupération des caecum de rats ont été réalisés par Christophe Del'Homme du centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix. La mesure des concentrations des métabolites intestinaux par spectrométrie de masse a été réalisée par Francis Beaudry.

2. Article II :

The N-acetylglucosamine-6-phosphate sensor NagC controls the virulence gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Cet article est en préparation et sera soumis pour publication dans le journal Gut Microbes

Authors

Guillaume Le Bihan¹, Philippe Garneau¹, Grégory Jubelin^{*2}, Annick Bernalier-Donadille², Christine Martin², Francis Beaudry³ and Josée Harel^{*1}

¹Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (CRIPA), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

²INRA, UR454 Unité de Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

*Corresponding authors mail to:

Josée Harel. Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc
(GREMIP), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-
Hyacinthe, QC, Canada

Phone: 450 773 8521 # 8233

Fax: 450 778 8108

Grégory Jubelin. INRA, UR454 Unité de Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-
Champanelle, France

Phone: (33) 4 73 62 42 43

Fax: (33) 4 73 62 45 81

2.1. Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 are human pathogen responsible for bloody diarrhea and renal failures in developed countries. EHEC O157:H7 employ a type III secretion system (T3SS) and secreted effectors to attach intimately to the human colonic epithelium and to cause disease. The T3SS is encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE) whose expression is highly regulated. Diverse signals, including nutrients, regulate the expression of *ler*, the central activator of the LEE genes. Amino sugars are carbon sources used by EHEC O157:H7 to colonize the intestinal tract of mammals. The amino-sugars N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-acetylglucosamine (GlcNAc) that regulate the production of adhesins in *E. coli* were tested for their ability to regulate the expression of the LEE genes in EHEC O157:H7. In this study, we demonstrate that Neu5Ac and GlcNAc down-regulate the expression of *ler* in a NagC-dependent manner. NagC is a transcriptional repressor of the GlcNAc and galactose catabolism in *E. coli* in the absence of intracellular N-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc 6-P), a by-product of Neu5Ac and GlcNAc catabolism. NagC was shown to be a transcriptional activator of *ler*, thereby controlling the metabolism and virulence in EHEC O157:H7. Neu5Ac and GlcNAc are mucin-associated sugars released in the intestinal lumen by the intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. These results indicate that EHEC O157:H7 evolved to control the LEE genes in response to Neu5Ac and GlcNAc. This highlights the role of intestinal symbionts in controlling the virulence of intestinal pathogens.

2.2. Introduction

Escherichia coli O157:H7 is a human foodborne pathogen frequently responsible for disease outbreaks in developed countries. Infections by EHEC occur predominantly following ingestion of contaminated food. These provoke symptoms ranging from aqueous or bloody diarrhea to renal failures as a consequence of the hemolytic and uremic syndrome. A range of virulence factors are involved in EHEC O157:H7 pathogenicity: the Shiga-toxin is associated with development of the hemolytic and uremic syndrome and the T3SS enables the pathogen to attach to the intestinal epithelium and cause diarrhea.¹

During infection, intestinal pathogens have evolved to control the expression of their virulence genes in a spatio-temporal manner leading to disease.² The T3SS is required by EHEC O157:H7 to attach to the intestinal epithelium of the colon and to inject effector proteins into the host cells.¹ T3SS-encoding genes are grouped on the LEE that is composed of five operons (LEE1 to LEE5).¹ The expression of LEE genes is tightly regulated and involves many regulators. The first gene of the LEE, *ler*, encodes for the activator of the five LEE operons.¹ The expression of *ler* itself is controlled by several regulators in response to specific environmental signals. EHEC O157:H7 are able to sense a range of microbiota- and host-derived compounds such as bacterial waste products,³ quorum-sensing molecules,⁴ hormones⁵ or cellular desquamation-derived compounds such as ethanolamine⁶ leading to appropriate regulation of its virulence. Moreover, EHEC O157:H7 sense nutrients to coordinate metabolism with virulence.⁷

In a previous study, we studied the adaptation of EHEC strain EDL933 to an intestinal environment, using human microbiota-associated rats compared to germ-free rats.⁸ Our results highlighted a clear metabolic switch from a glycolytic to an anaplerotic profile, as well as an inhibition of the expression of a large number of virulence genes involved in the formation of attaching and effacing lesions. We also showed that alternative carbon sources were used by the EHEC strain in this environment and we speculated that these could be important for EDL933 colonization of the intestine.⁸

In this study we demonstrate that both GlcNAc and Neu5Ac, which are found in the intestinal milieu, reduce the expression of the LEE and its adhesion to epithelial cells. We demonstrate that the N-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc 6-P) responsive regulator, NagC, is a positive regulator of the LEE genes while it is a repressor of the GlcNAc and galactose catabolic pathways in EHEC like in *E. coli* K12.^{9,10} Both GlcNAc and Neu5Ac repress the expression of the LEE in a NagC-dependent manner. Our results describe a new mechanism by which EHEC control the expression of its virulence genes in response to nutrient availability. NagC is a key regulator during the interaction of EHEC O157:H7 with mucin components by coordinating the metabolism with the virulence. GlcNAc and Neu5Ac are mucin-associated sugars that are released by bacterial symbionts into the intestinal lumen. Here, we show that the human intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* by releases GlcNAc and Neu5Ac from mucin in vivo. These results mean that the presence of specific bacterial symbionts can modify the virulence and the metabolic profile of EHEC by releasing nutrients.

2.3. Results

Neu5Ac and GlcNAc repress the expression of the LEE genes

Neu5Ac and GlcNAc that control adhesin production in *E. coli*,^{11,12} were tested for their ability to regulate the expression of genes encoding for the T3SS in EHEC O157:H7.

Beta-galactosidase assays were conducted in EHEC O157:H7 using the transcriptional fusion PLEE1:*lacZ* to assess the effect of Neu5Ac and GlcNAc on the activity of PLEE1 with *ler* being the first gene of the LEE1 operon and the master regulator of the LEE genes. Data showed that Neu5Ac at 1 mM and

GlcNAc at 0.1 mM and 1 mM had a repressive effect on the activity of PLEE1 (**Fig. 1A**).

To confirm this result, the expression of the five major LEE operons of EHEC O157:H7 was analysed by qRT-PCR after exposure to 0.1 mM or 1.0 mM of Neu5Ac and GlcNAc. The expression of *ler* (LEE1), *sepZ* (LEE2), *escV* (LEE3), *espB* (LEE4) and *tir* and *ae* (LEE5) was evaluated. The addition of 0.1 mM Neu5Ac was shown to significantly reduce the expression of *sepZ* and *espB* while 0.1 mM GlcNAc reduced also the expression of *tir* (**Fig. 1B**). When adding 1.0 mM Neu5Ac or GlcNAc the expression of all LEE operons was significantly repressed (**Fig. 1B**). These results were confirmed by examining the secretion of the effector EspB encoded by LEE4 gene. Both Neu5Ac and GlcNAc reduced the secretion of EspB in a dose-dependent manner (**Fig. 1C**). Phenotypically, the adhesion of EHEC O157:H7 to HeLa cells was significantly reduced when 1.0 mM Neu5Ac was added in the medium while 0.1 mM GlcNAc was sufficient to significantly reduce the adhesion (**Fig. 2A and 2B**).

The GlcNAc 6-P sensor NagC activates the expression of the LEE genes

When activated, the metabolic pathways required for the degradation of Neu5Ac and GlcNAc influence the activity of two transcriptional regulators, NanR and NagC, with NanR being inactivated by the intracellular Neu5Ac and NagC being inactivated by GlcNAc 6-P. GlcNAc 6-P is an intermediate of the Neu5Ac catabolic pathway and GlcNAc transport (**Fig. 3A**). Thereby, the $\Delta nanR$ and the $\Delta nagC$ isogenic mutants from EDL933 were created by allelic exchange in order to evaluate the potential role of these transcriptional regulators in the regulation of the LEE genes.

To evaluate the role of NanR and NagC on the activity of PLEE, plasmid pGLB containing the transcriptional fusion PLEE1:*lacZ* was introduced into $\Delta nanR$ and $\Delta nagC$ mutants, respectively. As shown in **Figure 3B**, the deletion of *nanR* had no significant effect while the *nagC* deletion led to a significant decrease

of the activity of PLEE1. The addition Neu5Ac- and GlcNAc further repressed the activity of LEE1 in the $\Delta nanR$ mutant but did not further repress the activity of LEE1 in the $\Delta nagC$ mutant indicating that LEE1 repression by the amino sugars was NagC-dependent and NanR-independent.

As tested by qRT-PCR down-regulation of the expression of LEE major operons was observed in the $\Delta nagC$ strain with a decreased expression of 2.9-fold for LEE1 encoding for *ler* (**Fig. 3C**). Their expression was restored at the wild-type level in a $\Delta nagC$ -complemented strain (**Fig. 3C**). Secretion assays also indicated a reduced secretion of the LEE4 encoded effector EspB in the $\Delta nagC$ strain as compared to the wild-type strain (**Fig. 3D**). These data suggest that NagC is required for full expression of the LEE genes and a high secretion of T3S effectors. To verify the role of NagC in the Neu5Ac- and GlcNAc-dependent repression of the LEE genes, the $\Delta nagC$ mutant was exposed to 1.0 mM Neu5Ac or GlcNAc and the expression level of the LEE genes was evaluated. Neither Neu5Ac nor GlcNAc affects the expression of the LEE genes in the $\Delta nagC$ mutant suggesting that NagC is responsible for the Neu5Ac- and GlcNAc-dependent repression of the LEE genes (**Fig. 3C**).

These results were confirmed by beta-galactosidase and secretion assays where Neu5Ac and GlcNAc did not affect PLEE1 activity and secretion of EspB in the $\Delta nagC$ mutant (**Fig. 3B** and **3D**). On HeLa cells, the adhesion of the $\Delta nagC$ mutant was two times lower than the wild-type strain, while complementation restored the wild-type attachment phenotype (**Fig. 2A** and **3B**). Altogether, these data clearly demonstrate the role of NagC as an activator of the expression of the LEE genes and of EHEC attachment to host cells.

NagC controls the metabolic profile of EHEC O157:H7

NagC is a transcriptional repressor of several catabolic genes in *E. coli* and is inactivated by intracellular GlcNAc-6P produced by the bacteria during the catabolism of Neu5Ac and transport of GlcNAc.¹⁰ NagC is known to repress the

expression of genes involved in the catabolism of GlcNAc and galactose in the absence of intracellular GlcNAc-6P.^{9,10} To verify its role in EHEC O157:H7, the effect of the *nagC* deletion and the presence of Neu5Ac and GlcNAc on the expression of *nagE*, *nagB* and *galP* encoding respectively for the GlcNAc PTS permease, the glucosamine-6-P deaminase and the major galactose transporter were analysed by qRT-PCR. Exposure of EDL933 to 1.0 mM Neu5Ac resulted in the activation of *nagB* and *nagE* while 1.0 mM GlcNAc activated additionally the expression of *galP* (**Fig. 4A**). While 0.1 mM GlcNAc had no effect on the expression of these genes, 0.1 mM Neu5Ac was sufficient to activate the expression of *nagB* (**Fig. 4A**). As expected, in the Δ *nagC* mutant, the expression of *nagE*, *nagB* and *galP* was induced 6.7-, 30.7- and 4.1-fold respectively and restored at the wild-type level in the Δ *nagC*-c strain (**Fig. 4B**). Together these results confirmed the role of NagC as a transcriptional repressor for the expression of *nagE*, *nagB* and *galP* and the role of Neu5Ac and GlcNAc in removing the NagC-dependent repression.

NagC binds directly to the promoter of *ler* in vitro

A NagC DNA binding sequence logo was generated from seven NagC binding sequences (**Fig 5A**) and a putative NagC binding site was identified visually with the help of Dre Plumbridge (Université Paris Diderot), on the promoter of *ler*. The sequence is located upstream from the proximal promoter, at a position that overlaps the -10 box of the distal promoter (**Fig. 5B**). It contains a 23-bp sequence (GTATTTTACACATTAGAAAAAAG) that shows homology with the DNA sequence logo presented in **Figure 5A**.

To determine whether NagC binds to the *ler* promoter region, the interaction of the protein with the DNA sequence encompassing both the proximal and the distal promoter was investigated by EMSA and by DNase I footprinting (**Fig. 5C**). EMSA experiments indicated that NagC produced a low-mobility complex that did not enter a 5% acrylamide gel as previously observed (data not

shown).¹¹ DNase footprinting experiments showed that NagC at 1.0 μ M protects a 29-bp region of the *ler* promoter containing the putative 23-bp NagC binding site (**Fig. 5C**). To confirm the specificity of the binding of NagC, a single base, at the position 18 of the NagC box (**Fig. 5A** and **5D**) was substituted by PCR directed mutagenesis. This site-directed mutagenesis of the putative NagC binding sequence removed the NagC protection indicating the specificity of the binding of NagC *in vitro* (**Fig. 5D**).

NagC contributes to the intestinal colonization of streptomycin treated mice

Streptomycin-treated mice provide a model for studying the intestinal colonization of commensal and pathogenic *E. coli*.^{13,14} Competition experiments between the wild-type strain EDL933 and the Δ *nagC* mutant were performed *in vivo* using streptomycin-treated mice. The ability of the strains to colonize and bind to the intestinal epithelium was evaluated by counting bacteria recovered from the feces and from the epithelium of the colon and the caecum, respectively. Bacterial counts from feces indicated that the Δ *nagC* mutant is outcompeted at day 6 by the wild-type strain EDL933 (**Fig. 6A**). Similarly, a lower amount of the Δ *nagC* mutant was recovered from the epithelium of the colon and the caecum as compared with the wild-type strain. Together, these results indicate that *nagC* is required for effective intestinal colonization and adherence to the intestinal epithelium in streptomycin-treated mice (**Fig. 6B**).

Neu5Ac and GlcNAc are intestinal compounds that are released by the human symbiont *B. thetaiotaomicron*.

Several bacterial species, including the intestinal symbiont *B. thetaiotaomicron* possess the enzymes required to release amino-sugars from the intestinal mucin.¹⁵ In order to investigate the role of *B. thetaiotaomicron* in the release of intestinal Neu5Ac and GlcNAc *in vivo*, *B. thetaiotaomicron* was

inoculated on germ-free rats and the level of Neu5Ac and GlcNAc was analysed in the cecal content of both germ-free rats (GFC) and rats associated with *B. thetaiotaomicron* (BTC). Results indicated that the concentration of Neu5Ac and GlcNAc was increased in the cecum of rats associated with *B. thetaiotaomicron* (**Fig. 7A**). The concentration of Neu5Ac and GlcNAc was respectively 8.6 ± 0.6 μ M and 5.8 ± 0.4 mM in GFC, while it reached 139.3 ± 6.6 μ M and 16.8 ± 3.2 mM in BTC, indicating that *B. thetaiotaomicron* released these two compounds in vivo. This confirms the previous observation that *B. thetaiotaomicron* release Neu5Ac from intestinal mucin of mice¹⁶ and highlights its potential for release of GlcNAc. Interestingly, the concentration of Neu5Ac was significantly decreased after the growth of EDL933 in the BTC indicating that the pathogen consumes the Neu5Ac that was released by *B. thetaiotaomicron* (**Fig. 7A**). This correlated with the activation of *nanaA* encoding the N-acetylneuraminidase required for the degradation of Neu5Ac. The concentration of GlcNAc was not significantly different before and after the growth of EDL933 in the GFC or in the BTC. The expression of *nagB*, *nagE* and *galP* was unchanged in the BTC as compared to the GFC, meaning that EDL933 did not consume GlcNAc (**Fig. 7A and 7B**).

The expression of the LEE genes is decreased in the BTC

To assess the effect of *B. thetaiotaomicron* on the expression of EHEC O157:H7 LEE genes, strain EDL933 was grown *in vitro* in the cecal content of germfree rats or in the cecal content of rats associated with *B. thetaiotaomicron*. The expression of the LEE genes was investigated by qRT-PCR. The expression level of the five LEE operons was quantified. Expression levels obtained after growth in the GFC were used as reference to assess the effect of growth in the BTC. When compared to growth in GFC, growth in BTC resulted in decreased expression of the five LEE operons (**Fig. 7C**). Together, these results indicate that the metabolic activity of *B. thetaiotaomicron* leads to decreased expression of T3SS genes in EHEC O157:H7.

Discussion

To succeed, EHEC O157:H7 have evolved several mechanisms to control the expression of its virulence genes in response to specific intestinal metabolites. In this study, the two amino sugars, Neu5Ac and GlcNAc, were shown to decrease the expression of the T3SS-encoding genes of EHEC O157:H7 in a NagC-dependent manner. NagC is the transcriptional repressor of the GlcNAc and galactose catabolic pathways and its DNA binding activity is inhibited by GlcNAc 6-P, an intracellular metabolite generated by the catabolism of Neu5Ac and the transport of GlcNAc.^{9,10} Here, we show that NagC promotes the expression of the T3SS-encoding genes, a transcriptional activation that is abrogated by the presence of Neu5Ac and GlcNAc. Moreover, the role of NagC as a transcriptional repressor of the GlcNAc and galactose catabolic pathways in EHEC O157:H7 was verified and confirmed. Together, our data indicate that GlcNAc and Neu5Ac are inducers of the GlcNAc and galactose catabolism, and repressors of the LEE genes of EHEC O157:H7.

The amino sugars Neu5Ac and GlcNAc are compounds associated with O-glycans that constitute intestinal mucins.¹⁷ Mucins are produced by intestinal epithelial cells. They form a dense mucous layer overlying the gut epithelium. The mucous layer of the gut is a physical barrier that limits the contact between bacteria and the host epithelial cells.¹⁸ Intestinal mucins are continuously produced by the host and degraded by the intestinal microbiota leading to a constant release of free monosaccharides derived from O-glycans in the intestinal lumen.¹⁸ The structure of O-glycans is widely diversified along the gut and predominantly composed of saccharides including GlcNAc and Neu5Ac, fucose, N-acetylgalactosamine, N-acetylmannosamine and galactose.¹⁷ During its infectious cycle, EHEC O157:H7 encounter a large amount of mucin-derived monosaccharides such as in the bovine small intestinal content where their total concentration reaches 4.2 mM, with 0.89 mM GlcNAc and 0.09 mM Neu5Ac.¹⁹ These sugars are used as carbon sources by several bacteria including commensal

and pathogenic *E. coli*.^{14,19} In *E. coli*, the catabolism of Neu5Ac and GlcNAc induces transcriptional responses mediated by NanR and/or NagC¹¹ with one controlling the Neu5Ac catabolism and the last controlling both GlcNAc and galactose catabolism.^{9,10} Activation of the expression of *galP* in response to GlcNAc is an interesting fact. We hypothesize that the NagC-dependent regulation of *galP* is a strategy used by *E. coli* to co-metabolize galactose together with Neu5Ac or GlcNAc in the intestines, where the catabolism of Neu5Ac or GlcNAc triggers the catabolism of galactose. Supporting this hypothesis, galactose is contained in mucins and released in the intestinal lumen together with Neu5Ac and GlcNAc.^{17,19} Moreover, *E. coli* K12 and EHEC O157:H7 are able to co-metabolize *in vitro* up to nine sugars at a time starting first with the co-metabolism of GlcNAc and galactose.¹⁴ Thereby, it would be advantageous for *E. coli* to trigger several catabolic processes simultaneously to promote rapid growth in the intestines.

While being a repressor of catabolic genes, NagC activates the T3SS-encoding genes required for the attaching and effacing lesions and binds to the promoter of *ler*. NagC is best characterized as a repressor,^{9,10} but can act as a transcriptional activator as in the case of the regulation of *glmUS* and *fimB* expression.^{11,20} This indicates that NagC is a central regulator in EHEC O157:H7 in coordinating the metabolism and the virulence. *In vivo* competition experiments indicate that NagC is required for an efficient colonization of the intestinal tract and for binding to the intestinal epithelium of streptomycin-treated mice. This is indicated by the impaired ability of the Δ *nagC* mutant to compete with the wild-type EDL933. Such a NagC-dependent activation of adhesin production was observed in *E. coli* K12, where together with NanR, NagC activates the expression of the recombinase-encoding gene FimB. FimB controls the expression of the *fim* genes and the production of the type I fimbriae.¹¹ FimB was shown to be involved in phase variation of the type I fimbriae by inducing either the on-to-off or the off-to-on switch.²¹ During the catabolism of GlcNAc, the inactivation of NagC inhibits the off-to-on phase variation and thereby inhibits the *E. coli* K12 fimbriation.¹¹ Authors hypothesized that shutting down fimbriation in response to

Neu5Ac and GlcNAc could be a strategy used by *E. coli* to avoid intense host immune system stimulation.¹¹ However, EHEC O157:H7 do not produce type I fimbriae.²² Here, we propose that by regulating the expression of the T3SS-encoding genes, NagC regulates the planktonic versus attached state of EHEC O157:H7 in response to the presence of Neu5Ac and GlcNAc. In high concentrations of Neu5Ac and GlcNAc, the metabolism of Neu5Ac, GlcNAc and the co-metabolism of galactose are activated, promoting the growth of the pathogen while attachment to epithelial cells is inhibited. In low concentrations of Neu5Ac and GlcNAc or when these saccharides are consumed by competitors, the metabolism is inhibited and the attachment to epithelial cells is promoted. Interestingly, it has been demonstrated that attaching and effacing pathogens utilize their T3SS to relocate from the intestinal lumen to the epithelial layer of the gut to avoid rapid clearance from the gut due to competition with the microbiota.²³

Currently, we do not know exactly how NagC activates the LEE1 promoter, but two general scenarios seem most plausible. We suggest that either NagC contacts RNA polymerase directly (or another regulatory protein bound closer to the promoter) to enhance transcription activation, or that the nucleoprotein complex that includes NagC and another regulator alters the DNA structure nearer the promoter to facilitate transcription initiation.

Neu5Ac and GlcNAc are released *in vivo* by the intestinal symbiont *B. thetaiotaomicron*. In BTC the concentration of Neu5Ac was increased 16.2-fold reaching $139.3 \pm 6.6 \mu\text{M}$ and that of GlcNAc to 2.9-fold reaching $16.8 \pm 3.3 \text{ mM}$ as compared to the GFC. Few data are available on the concentration of amino sugars in the intestines of mammals. In the bovine small intestinal content the concentration of GlcNAc reaches 0.89 mM while the concentration of Neu5Ac reaches 0.09 mM.¹⁹ *B. thetaiotaomicron* is a high producer of hydrolases, including sialidase and N-acetylglucosaminidase, required to degrade mucin polysaccharides.^{15,24} The release of intestinal Neu5Ac by *B. thetaiotaomicron*, previously observed in mice, was dependent of the production of a single sialidase.²⁵ In the same report, authors showed that the release of Neu5Ac by *B.*

thetaitaomicron in mice contributes to enhancing the growth of enteric pathogens such as *Clostridium difficile* or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.²⁵

The expression of all five operons of LEE was down-regulated in the BTC as compared to the GFC. Could this be due to a higher consumption of Neu5Ac and GlcNAc by EDL933? The up-regulation of the *nan* catabolic pathway in BTC correlated with the increase in Neu5Ac concentration (**Fig. 7A** and **7B**). However, even if the GlcNAc concentration were increased in the BTC as compared to the GFC, the expression level of the *nag* catabolic pathway was unchanged. This indicates that the regulatory activity of NagC is similar in both media (**Fig 7A** and **7B**). This could be explained by the high concentration of GlcNAc that might be saturating in the GFC and the BTC. Thus, the down-regulation of the LEE genes in the BTC might be due to another mechanism. Another mucin-derived sugar released by *B. thetaitaomicron* was actually shown to regulate the expression of the T3SS-encoding genes in EHEC O157:H7 and has been suggested to be a participant in the intestinal relocation of the pathogen. A study of Pacheco *et al.* demonstrated that mucin-released fucose represses the production of the T3SS by inducing a signal transduction mediated by a newly identified two component system named FusKR where FusR is a repressor of both *ler* and genes required for fucose utilization.⁷ Moreover, the metabolic activity of *B. thetaitaomicron* can influence the metabolic profile of the pathogen. This can then affect the activation state of the LEE encoding genes through a regulatory mechanism involving the sensing of metabolic intermediaries inside the bacteria by Cra, a regulator of gluconeogenic genes that binds directly to the *ler* promoter.^{26,27}

In this study, we described a novel mechanism by which EHEC O157:H7 regulate the expression of its T3SS-encoding genes in response to intestinal saccharides derived from mucins (**Fig. 8**). The GlcNAc 6P sensor NagC was shown to be an activator of *ler* that favors the adherence of O157:H7 *E. coli* on intestinal cells. Its transcriptional activity was abrogated by the catabolism of Neu5Ac and GlcNAc leading to a repression of the LEE genes. The link between the nutrient availability and EHEC virulence gene expression is now demonstrated

by several reports. Since several species of the intestinal microbiota including commensal *E. coli* or producers of hydrolases such as *B. thetaiotaomicron*^{15,28} have a direct influence on the nutrient availability, future research is needed to determine the role of the microbiota in the symbiosis of EHEC in bovine or human pathogenesis.

2.4. Experimental procedures

Bacteria, mutagenesis and growth conditions

Strains and plasmids are listed in **Table S1**. The EHEC O157:H7 strain EDL93329 was used in this study. The EDL933 Δ *nagC* and Δ *nanR* mutants were generated by allelic exchange using a suicide vector as previously described.³⁰ Briefly, the kanamycin cassette from pKD13 was amplified and flanked by PCR with the 500 bp sequences adjacent to the ORF of *nagC* or *nanR* using the primers listed in **Table S2** and containing the restriction site for the enzyme *AscI* and *SacI* respectively. The resulting amplicon was cloned into the pGEM®-T plasmid. The amplicon was then removed from pGEM®-T by digestion using the enzymes *AscI* and *SacI*, and ligated into the suicide plasmid pMEG-375. The λ *pir* and Δ *asdA4* strain χ 7213 was used to transfer the construction into EDL933 by conjugation. A selection of single crossover kanamycin resistant mutants was performed followed by a selection of double crossover mutants using the *sacB* counterselection on LB agar plate without NaCl but with 5% sucrose.³¹ EDL933 Δ *nagC* and Δ *nanR* mutants were control by PCR and sequencing. Since *nagC* is in the *nagABCD* operon, the polarity of the *nagC* deletion was verified by analysing the expression of *nagD* by qRT-PCR. Complementation was performed using the pTrc99a expression plasmid. The *nagC* ORF was amplified from the genome of EDL933 using the primer listed in **Supplemental Table 2** and inserted into pTrc99a, downstream from the IPTG inducible pTrc promoter. Experiments using the

complemented $\Delta nagC$ mutant were performed with the basal activity of pTrc, that is, without IPTG induction. The complementation efficiency was verified by quantifying the expression of *nagC* in the wild-type EDL933 and the complemented $\Delta nagC$ strain.

A single colony of EDL933 or isogenic mutants was grown overnight in DMEM 0.2% glucose supplemented with 0.1 mM MOPS. The overnight cultures were then diluted 1:100 in fresh medium and incubated until OD₆₀₀ of 0.6 at 37°C under agitation. When required, the medium was supplemented with kanamycin (25 mg/ml), ampicillin (50 mg/ml), Neu5Ac (100 μ M or 1 mM) or GlcNAc-6P (100 μ M or 1 mM).

Beta-galactosidase assays

The entire intergenic region between *ler* (LEE1) and *espG* (bp-1225 to +19) containing two *ler* promoters^{32,33} was amplified using primers containing a BamHI restriction site (**Supplemental Table 2**) and subcloned into the plasmid pGEM®-T (Promega). The intergenic region was then integrated upstream the *lacZ* ORF of pRS551 using a BamHI digestion and the T4 ligase (Promega). The resulting plasmid, pGLB (**Supplemental Table 1**) was integrated into EDL933 or its isogenic mutants for Beta-galactosidase assays in the presence or absence of Neu5Ac or GlcNAc. Bacteria were grown as described above until OD₆₀₀ of 0.6 in DMEM medium. Beta-galactosidase assays were performed as described previously.³⁴ The efficiency of the transcriptional fusion was evaluated by measuring the activity of the *ler* promoter in the DMEM and LB media, where DMEM induces a higher expression of *ler* (data not shown).¹⁶

RNA Extraction and qRT-PCR

Bacteria were harvested at OD₆₀₀ of 0.6 and RNA was extracted as previously described.⁸ cDNAs were synthesized from ten μ g ARN using reverse

transcriptase. The concentration of cDNA samples was then adjusted to 25 ng/ μ L. qRT-PCR assays were performed using primers listed in **Supplemental Table 2**. A standard curve was performed for genes of interest to determine the copy number of targeted transcripts in 50 ng of cDNA. For transcriptomic analysis in DMEM, *rpoA* was used as the housekeeping gene to normalize the data since its expression was unchanged in the different conditions, while in the cecal contents of rats, *tufA* was used as the housekeeping gene. Results are presented as the ratios between the cDNA's copy number of the gene of interest and the cDNA's copy number of the housekeeping gene.

Western-blot analysis

Western-blot analyses were performed with slight modifications to those previously described.³⁵ Culture supernatants (8 ml) were harvested and supplemented with 1 ng Bovine Serum Albumin (BSA). BSA was used as protein precipitation and loading controls. Proteins were precipitated overnight at 4°C using 10% trichloroacetic acid and sodium deoxycholate, pelleted by centrifugation, washed with acetone, resuspended in SDS sample buffer and boiled. Proteins were then run on 14% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. The whole protein transfer including BSA was revealed using Ponceau S dye. The EspB protein was revealed using a rabbit EspB specific polyclonal antiserum (1:2000) and a goat anti-rabbit HRP-linked secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The protein EspB was detected by chemiluminescence.

HeLa cell cultures and infections

The HeLa epithelial cell line was maintained in MEM with 10% FBS, 100 U/mL and 100 mg/mL streptomycin at 37°C under 5% CO₂. HeLa cells were seeded into 6-well plates ($5 \cdot 10^5$ cells/well) and grown for 24 hours without

antibiotics. Bacteria were pregrown in DMEM in the presence or absence of Neu5Ac or GlcNAc before the infection assays. HeLa cells were then washed and infected with bacteria with a MOI of 10 for 90 minutes, in the presence or absence of Neu5Ac or GlcNAc. After 3 washes with DPBS, cells were fixed using methanol for 15 min and stained with Giemsa for 15 min. The number of adherent bacteria on HeLa cells was evaluated by CFU counting on LB agar plates. Briefly, HeLa cells were trypsinized for 5 minutes at 37°C, pelleted by a low-speed centrifugation (100 g; 3 min) and washed once to ensure the plating of adherent bacteria only. Results are presented as the percentage of adherent bacteria as compared to the wild-type strain incubated in the complete MEM medium. The EDL933 $\Delta escN$ strain that does not produce the T3SS³⁶ was used as a negative control.

Mice infection

BALB/c mice were purchased from Janvier Labs (Le-Genest-St-Isle, France). Two sets of 5 mice aged 5 weeks were given drinking water containing streptomycin sulfate (5 g/l) throughout the experiment. On day one following the addition of streptomycin, each mouse was infected intragastrically with 100 μ l of a mix containing 10^7 each of EDL933 Sm^R and EDL933 Sm^R $\Delta nagC$ strains. At indicated time points, fecal or tissue samples were collected, homogenized in PBS and subsequently diluted before plating on LB-streptomycin agar plates and LB-streptomycin-kanamycin agar plates. Output ratios were calculated for each time point and competitive indices were obtained by dividing the output ratio by the input ratio. All animal experiments were reviewed and approved by the Auvergne Committee for Animal Experimentation.

Production of the NagC protein and analysis of NagC-binding sites

NagC was produced and purified by Genscript as follows. The NagC gene was cloned in a modified pGEX vector that contained a thrombin protease recognition site between the Glutathione S-Transferase (GST) tag and a multiple cloning site. Following the elution of NagC-GST using Glutathione Sepharose resin, the fused protein was cleaved by thrombin protease to remove the GST affinity Tag. The cleavage reaction was incubated again with Glutathione Sepharose 4B beads and the flow-through containing cleaved NagC was collected. The protein concentration was determined by Bradford protein assay with BSA as a standard, and the purity was about 80% as estimated by densitometric analysis of the Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel.

The NagC-binding sequence logo of the strain EDL933 was generated from seven NagC-binding sequences located on the promoters of *nagB*, *nagE*, *galP*, *glmU*, *fimB* and *chbB* identified previously^{9,11,20,37} and using the software Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

For the footprinting experiments, the intergenic region of *nagB* and *nagE* (296 bp) as well as the promoter region of LEE1 (259 bp) were end-labeled with ³²P (125,000 cpm, 0.3 nM) and subsequently incubated in a total volume of 20.0 µl with 0.1 µg of calf thymus DNA, 0.1 µg of BSA and with the NagC protein at concentrations ranging from 62.0 nM to 1.0 µM in binding buffer (60 mM Tris-HCl [pH 7.5], 40.0 mM KCl, 100.0 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT). After incubation for 10 min at room temperature, 2.0 µl of DNase I (200.0 U/ml; New England BioLabs) containing 22.0 mM CaCl₂ and 22.0 mM MgCl₂ was added for 4 min (top fragment) and 6 min (bottom fragment). The reaction was stopped by the addition of 100.0 µl of stop buffer (10% glycerol, 2.5 mM EDTA, 0.6 M ammonium acetate, 2.0 mg yeast tRNA per ml) to each sample. DNA fragments were precipitated in ethanol, and amounts with equivalent cpm (5 X 10⁴) from each reaction were loaded onto 6% polyacrylamide–7 M urea gels. Maxam-Gilbert A+G reactions were carried out on the appropriate ³²P-labeled DNA fragments, and the products loaded alongside the DNase I footprinting reaction mixtures. The gels were dried and analyzed by autoradiography.

***B. thetaiotaomicron* associated rats**

Ten germ-free adult male Fisher 344 rats, without impaired functions and provided by the breeding facilities of the Anaxem platform of INRA (Micalis Unit, Jouy-en-Josas, France) were used in this study. Breeding was performed at INRA (unité de Microbiologie, centre INRA Clermont-Ferrand – Theix) as previously described.³⁸ Briefly, rats were kept in germfree isolators with controlled light, temperature and humidity, and fed with sterilized food and water. To reproduce the diversity of a human-type diet, the food contained lipids and proteins of animal and plant origins, sucrose and cooked starch.³⁹ The 10 rats were randomly separated into 2 groups of 5 individuals. The first group was inoculated orally with 1.0 mL of a fresh overnight-growing culture of *B. thetaiotaomicron* and a second group was kept germfree and used as reference. *B. thetaiotaomicron* was enumerated from rats' feces at day 8 to check for intestinal colonization. After two weeks, rats were sacrificed by CO₂ inhalation. The caecal contents from each group were harvested, pooled and centrifuged for 30 min at 7,000 g. Supernatants were withdrawn and filtered using a 0.2- μ m filter. Filtrates were half diluted in mineral solution and glucose was added to a final concentration of 0.2%; pH was adjusted to 7.0 by the addition of 10.0 N NaOH. Finally, the *B. thetaiotaomicron* associated rats' cecal content (BTC) and the germfree rats' cecal content (GFC) were filtered (0.2 μ m) and used as culture media for the EDL933 strain. Growths were performed at least in triplicate in both media.

Mass spectrometry

The concentrations of Neu5Ac and GlcNAc were determined using a High-Performance Liquid Chromatography–Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry (HPLC-SRM MS) assay. Briefly, 50 μ L of matrix samples (i.e. GFC and BTC) were mixed with 500 μ L of internal standard solution (100 μ M of stable

isotope labeled products of Neu5Ac and GlcNAc). The samples were then vortexed vigorously and centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial.

Ten μ L of samples were injected with a Perkin Elmer Series 200 HPLC (Shelton, CT) onto a Thermo Biobasic C18 5 x 1 mm column (5 μ m) with a flow rate of 100 μ L/min. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and 20 mM ammonium acetate aqueous solution (pH \approx 7.0) at ratio of 50:50. The AB SCIEX API 2000 QTRAP mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) interfaced with the HPLC system used a pneumatic assisted electrospray ion source operating in negative and positive ion modes. Nitrogen gas 1 was set to 15 PSI; nitrogen gas 2 was set to 25 PSI; and the electrospray electrode was set to -4000V in negative mode and 5000V in positive mode. The declustering potential (DP) was set to 30V and the collision energy (CE) was set to 30V. The selected reaction monitoring (SRM) transitions were set to 308 \rightarrow 87 (Neu5Ac; negative mode), 311 \rightarrow 90 ($^2\text{H}_3$ -Neu5Ac; negative mode), 222 \rightarrow 204 (GlcNAc; positive mode), 224 \rightarrow 206 ($^{13}\text{C}_2$ -GlcNAc; positive mode). The dwell time was set to 100 msec and the pause time at 5 msec. Ratios of the light- and heavy-isotopic pairs were used for quantification.

Ethics statement

All procedures were carried out according to the European directives for the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU. The laboratory is bound to the guidelines of the local ethics committee CEMEAA 02. The protocol (registered number CE 120-02) was approved by the local ethics committee CEMEA Auvergne.

2.5. Acknowledgments

We thank C. Del’Homme for technical assistance with harvesting and filtering cecal contents; and Christophe Chassard and Yolande Bertin for critical reading of the manuscript. We are grateful to Dre J. Plumbridge (Université Paris Diderot) for help in identifying putative NagC binding DNA sequences.

G.L.B. was supported by a scholarship from the Institut de recherche en santé publique de l’Université de Montréal-Fonds de recherche du Québec-santé (Project 40148). This work was also supported in part by the 61st Session de la Commission permanente de coopération franco-qubécoise (Project 61. 116 to CM and JH), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Strategic and Discovery Grants to JH, RGPIN STP 307430 and SD-25120-09, respectively) and by EADGENE, N FOOD-CT-2004-506416, Network of Excellence under the 6th Research Framework Program of the European Union (CM).

2.6. References

1. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, et al. (2013) Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 15: 610-622.
2. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, et al. (2008) Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 76: 1143-1152.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
4. Barnett Foster D (2013) Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* 4: 315-323.

5. Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, et al. (2009) Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 155: 521-530.
6. Sircili MP, Walters M, Trabulsi LR, Sperandio V (2004) Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect Immun* 72: 2329-2337.
7. Walters M, Sperandio V (2006) Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 74: 5445-5455.
8. Kendall MM, Gruber CC, Parker CT, Sperandio V (2012) Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio* 3.
9. Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, et al. (2012) Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492: 113-117.
10. Le Bihan G, Jubelin G, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Martin C, et al. (2014) Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 grown *in vitro* in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes. *Microbes Infect*.
11. El Qaidi S, Allemand F, Oberto J, Plumbridge J (2009) Repression of *galP*, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. *Mol Microbiol* 71: 146-157.
12. Plumbridge JA (1991) Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* 5: 2053-2062.
13. Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA, Blomfield IC (2004) Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16322-16327.
14. Barnhart MM, Lynem J, Chapman MR (2006) GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 5212-5219.

15. Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, et al. (2004) Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun* 72: 1666-1676.
16. Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF (2014) Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *MBio* 5: e00909-00914.
17. Abe H, Tatsuno I, Tobe T, Okutani A, Sasakawa C (2002) Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70: 3500-3509.
18. O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB (1983) *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1: 702.
19. Bertrand N, Houle S, LeBihan G, Poirier E, Dozois CM, et al. (2010) Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* 78: 5324-5331.
20. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137-141.
21. Sperandio V, Li CC, Kaper JB (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* 70: 3085-3093.
22. Porter ME, Mitchell P, Free A, Smith DGE, Gally DL (2005) The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J Bacteriol* 187: 458-472.
23. JH M (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

24. Chekabab SM, Jubelin G, Dozois CM, Harel J (2014) PhoB activates *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation. PLoS One 9: e94285.
25. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, et al. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3597-3602.
26. El Qaidi S, Plumbridge J (2008) Switching control of expression of *ptsG* from the Mlc regulon to the NagC regulon. J Bacteriol 190: 4677-4686.
27. Plumbridge J (1995) Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. EMBO J 14: 3958-3965.
28. de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, et al. (2009) Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 77: 783-790.
29. Lan A, Bruneau A, Philippe C, Rochet V, Rouault A, et al. (2007) Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. Br J Nutr 97: 714-724.
30. Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC (2004) Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. Biochem J 384: 307-316.
31. McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat Rev Microbiol 9: 265-278.
32. McClain MS, Blomfield IC, Eisenstein BI (1991) Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. J Bacteriol 173: 5308-5314.
33. Roe AJ, Currie C, Smith DG, Gally DL (2001) Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. Microbiology 147: 145-152.

34. Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, et al. (2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 336: 1325-1329.
35. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, et al. (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299: 2074-2076.
36. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, et al. (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502: 96-99.
37. Njoroge JW, Nguyen Y, Curtis MM, Moreira CG, Sperandio V (2012) Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio* 3: e00280-00212.
38. Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, et al. (2014) The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe* 16: 759-769.
39. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T (2013) Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8: e53957.

2.7. Legends

Figure 1. Neu5Ac and GlcNAc regulate LEE expression. (A) β -galactosidase assays using the pGLB plasmid integrated into EDL933. EDL933 was grown in DMEM with or without Neu5Ac or GlcNAc 0.1 or 1.0 mM and cells were harvested at OD₆₀₀ = 0.6. Results are presented as Miller Units and are the means and standard errors from at least three independent experiments. (B) qRT-PCR measurement of the LEE genes expression. EDL933 was grown in DMEM with or

without Neu5Ac or GlcNAc. Results are shown as the ratio copy number of the LEE genes / copy number of *rpoA*, and are the means and standard errors from at least three independent experiments. (C) Western Blot analysis of the EspB secretion by EDL933 grown in DMEM with or without Neu5Ac or GlcNAc. BSA was used as a loading control. Student's t-tests were performed to calculate p values. ns for non-significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Figure 2. Adhesion of EDL933 to HeLa cells. (A) HeLa cells were co-incubated with EDL933 in presence or absence of Neu5Ac or GlcNAc for 90 minutes. Bacteria and cells were visualized after Giemsa staining. The $\Delta escN$ strain was used as a negative control for the T3SS dependent adherence. (B) The number of adherent bacterial cells was evaluated by CFU counting. The results are presents as the percentage of adherent bacteria as compared to the wild-type strain incubated in DMEM without Neu5Ac and GlcNAc, and are the means and standard errors from at least three independent experiments. Student's t-tests were performed to calculate p values. ns for non-significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Figure 3. NagC activates the LEE genes expression. (A) Schematic representation of the influence of Neu5Ac and GlcNAc on the activity of the transcriptional regulators NagC and NanR. NanR is inactivated in presence of intracellular Neu5Ac while NagC is inactivated by intracellular GlcNAc-6-P derived from the Neu5Ac catabolism or the GlcNAc transport. (B) β -galactosidase assays using the pGLB plasmid integrated into EDL933 or the isogenic mutants $\Delta nagC$ and $\Delta nanR$. The strains were grown in DMEM with or without Neu5Ac or GlcNAc 0.1 or 1.0 mM and cells were harvested at $OD_{600} = 0.6$. Results are presented as Miller Units and are the means and standard errors from at least three

independent experiments. (C) qRT-PCR measurement of the LEE genes expression. EDL933, the isogenic mutant $\Delta nagC$ and the complemented strain $\Delta nagC$ -c were grown in DMEM with or without Neu5Ac or GlcNAc. Results are shown as the ratio copy number of the LEE genes / copy number of *rpoA*, and are the means and standard errors from at least three independent experiments. (D) Western Blot analysis of the EspB secretion by EDL933, the isogenic mutant $\Delta nagC$ and the complemented grown in DMEM with or without Neu5Ac or GlcNAc. BSA was used as a loading control. Student's t-tests were performed to calculate p values. ns for non-significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Figure 4. NagC represses the expression of nagB, nagE and galP. (A) qRT-PCR measurement of the expression of *nagE*, *nagB* and *galP* in the wild type strain EDL933 incubated with or without Neu5Ac or GlcNAc. (B) qRT-PCR measurement of the expression of *nagE*, *nagB* and *galP* in the wild type strain EDL933, in the $\Delta nagC$ mutant and in the complemented strain $\Delta nagC$ -c. Results are shown as the ratio copy number of the tested genes / copy number of *rpoA* and are the means and standard errors from at least three independent experiments. Student's t-tests were performed to calculate p values. ns for non-significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Figure 5. Analyze of the NagC binding on the promoter of *ler*. (A) Weblogo generated from seven known NagC binding sequences. (B) Schematic representation of the regulatory region of *ler* expression and location of the putative NagC binding site. The -35 and -10 boxes of the proximal and the distal promoters are underlined in green and the putative NagC binding site is underlined in red. (C) Maxam-Gilbert (A+G) reactions and footprinting experiment realized with the reversed labeled PCR product of the original *ler* regulatory region and

with NagC used at concentrations ranging from 65 nM to 1 μ M. The DNA sequence of the protected region is indicated and the nucleotide sequence corresponding to the NagC putative binding sequence is indicated in bold. **(D)** Maxam-Gilbert (A+G) reactions and footprinting experiment realized with the reversed labeled PCR product of the mutated *ler* regulatory region. The nucleotide sequence corresponding to the NagC putative binding sequence is indicated in bold and the base substitution (T \rightarrow C) is indicated in red.

Figure 6. The Δ nagC mutant is outcompeted by the WT strain during infection. Streptomycin treated BALBc mice were infected with a 1:1 ratio mixture of WT and Δ nagC EDL933 strains. **(A)** WT (black circle) and Δ nagC (blue square) strains were numerated from feces at indicated time points. The competitive indices are shown in the right panel. **(B and C)** Eight days after infection, mice were sacrificed and WT (black circle) and Δ nagC (blue square) strains were numerated from colonic **(B)** and cecal **(C)** tissues. Means and standard error of the mean are indicated. For A, B and C, **p < 0.01; ***p < 0.001 by Student's unpaired t test.

Figure 7. Analyses of the Neu5Ac and the GlcNAc concentrations and the genetic regulation in EDL933 in the BTC. **(A)** Concentrations of Neu5Ac and GlcNAc in GFC and BTC as measured by HPLC-SRM MS. Measures were performed in triplicate before and after the growth of EDL933 in GFC and in BTC. **(B)** qRT-PCR measurement of the expression of *nanA*, *nagE*, *nagB* and *galP* in the wild type strain EDL933 grown in the GFC and the BTC. Results are shown as the ratio copy number of the tested genes / copy number of *tufA*. **(C)** qRT-PCR measurement of the expression of the LEE genes in the wild type strain EDL933 grown in the GFC and the BTC. Results are shown as the ratio copy number of the tested genes / copy number of *tufA*. The results are the means and standard errors

from at least three independent experiments. Student's t-tests were performed to calculate p values. ns for non-significant, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Figure 8. Model for the regulation of the metabolism and the LEE genes by NagC. In our model, free amino sugars such as Neu5Ac and GlcNAc are released from the intestinal mucin by bacterial glycosidases that are transported into *E. coli* cells and metabolised. Neu5Ac is metabolised into GlcNAc-6P by the action of NanK, NanA and NanE while GlcNAc is transported and directly phosphorylated to give GlcNAc-6P. In presence of GlcNAc-6P, NagC is inactivated which lead to the activation of the expression of *nagB*, *nagE* and *galP* and a repression of *ler*.

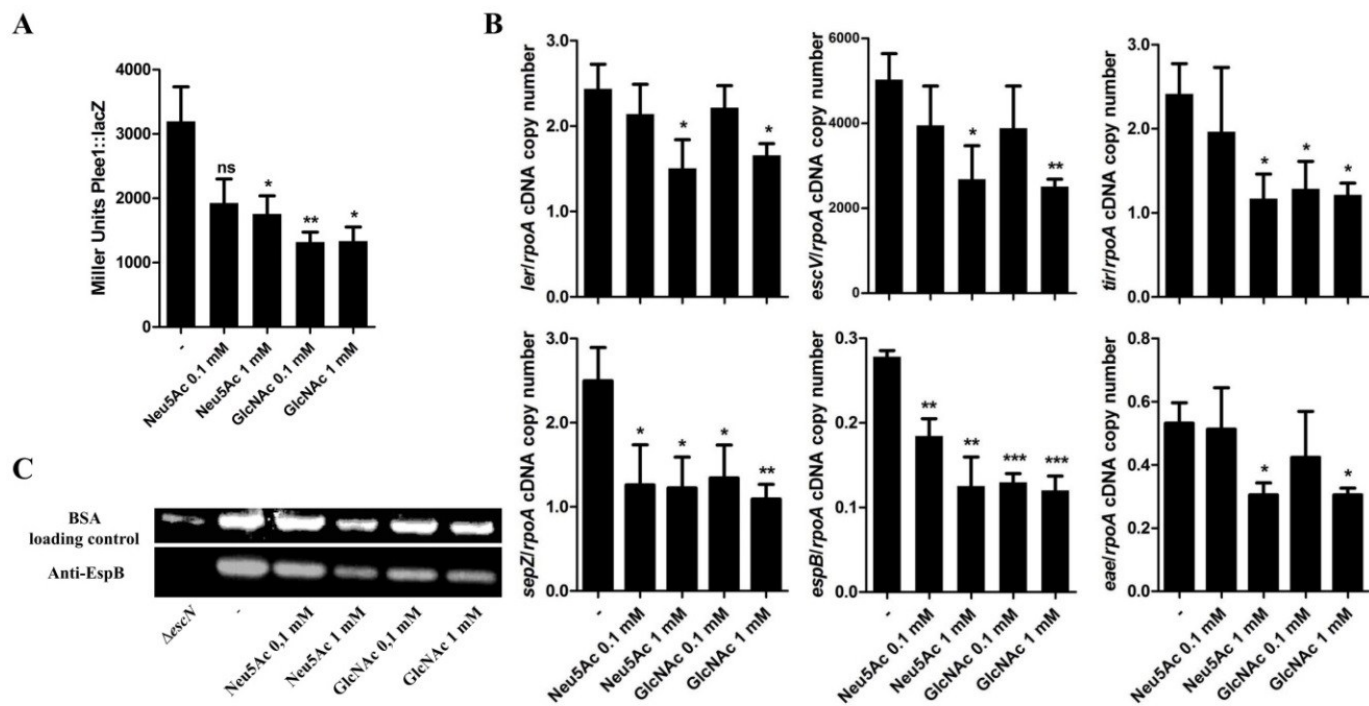


Figure 1

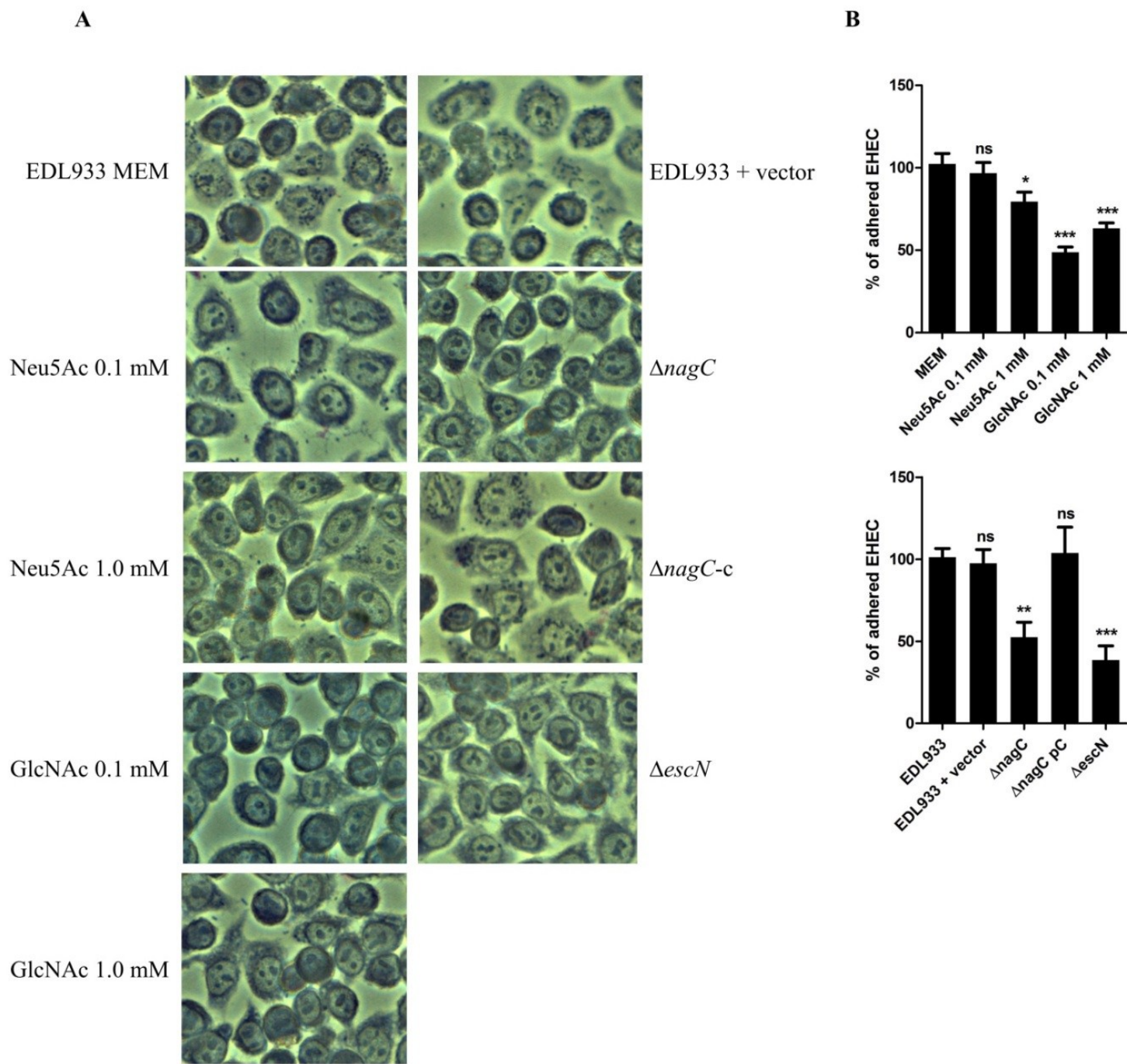


Figure 2

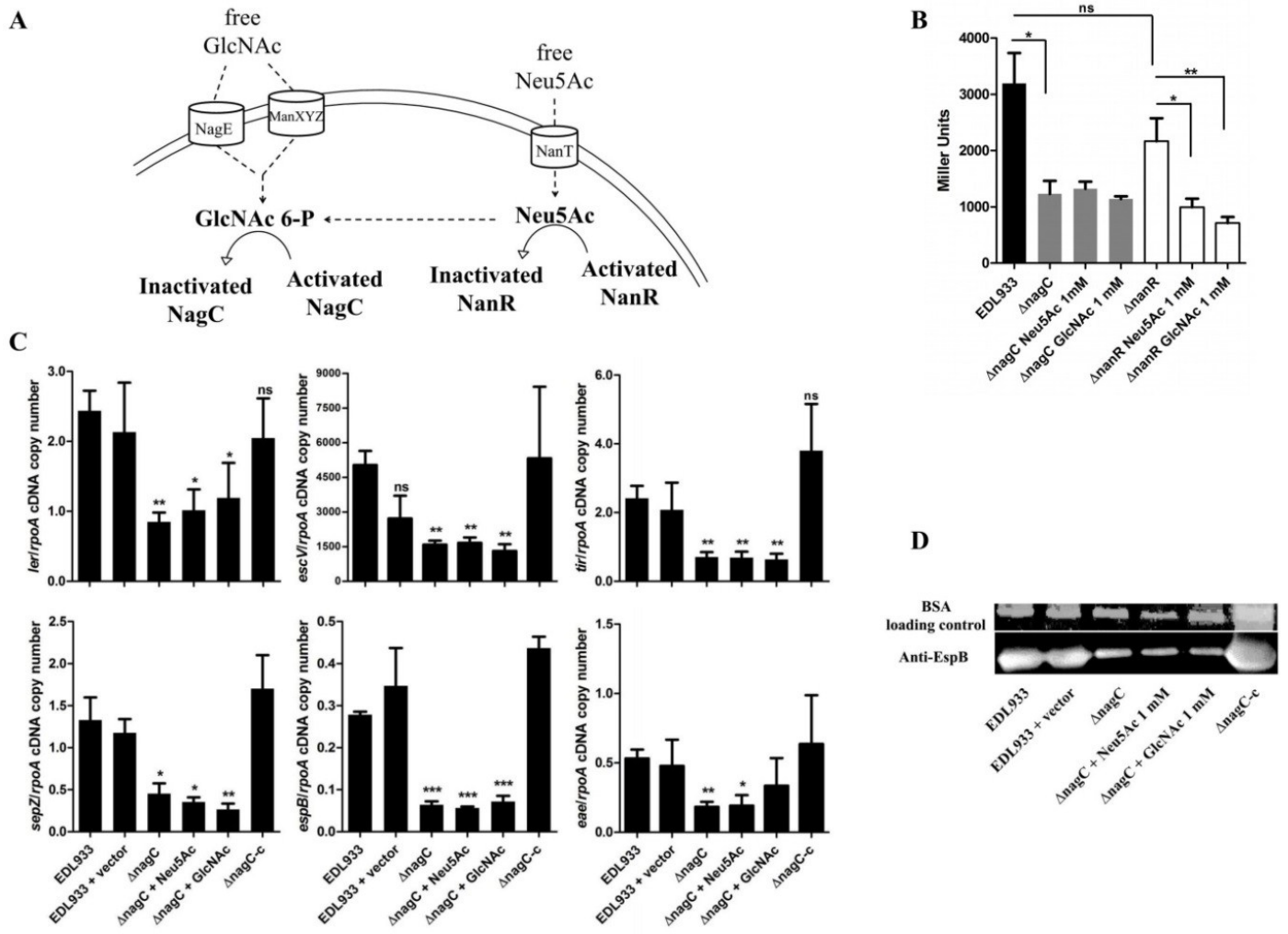


Figure 3

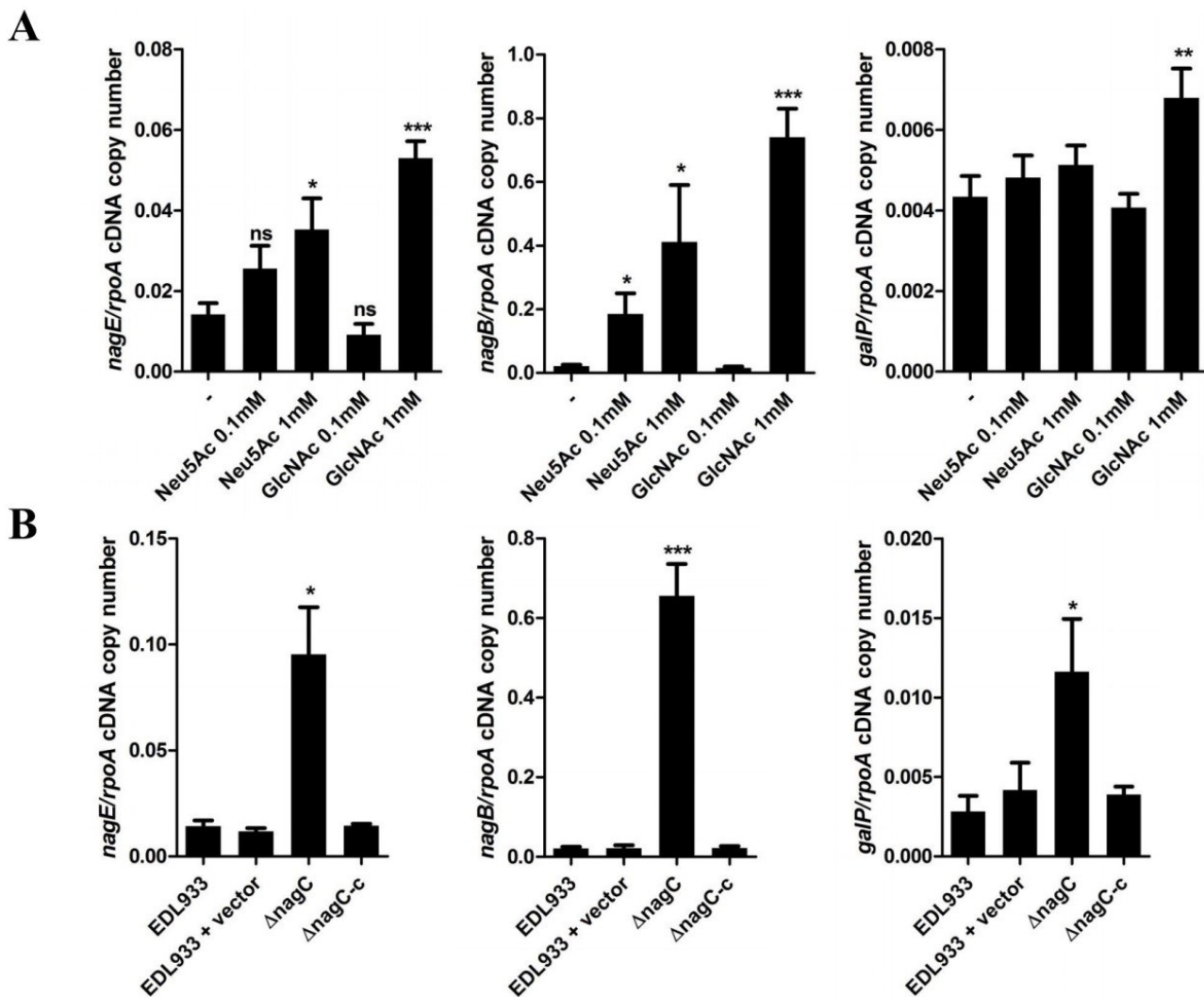


Figure 4

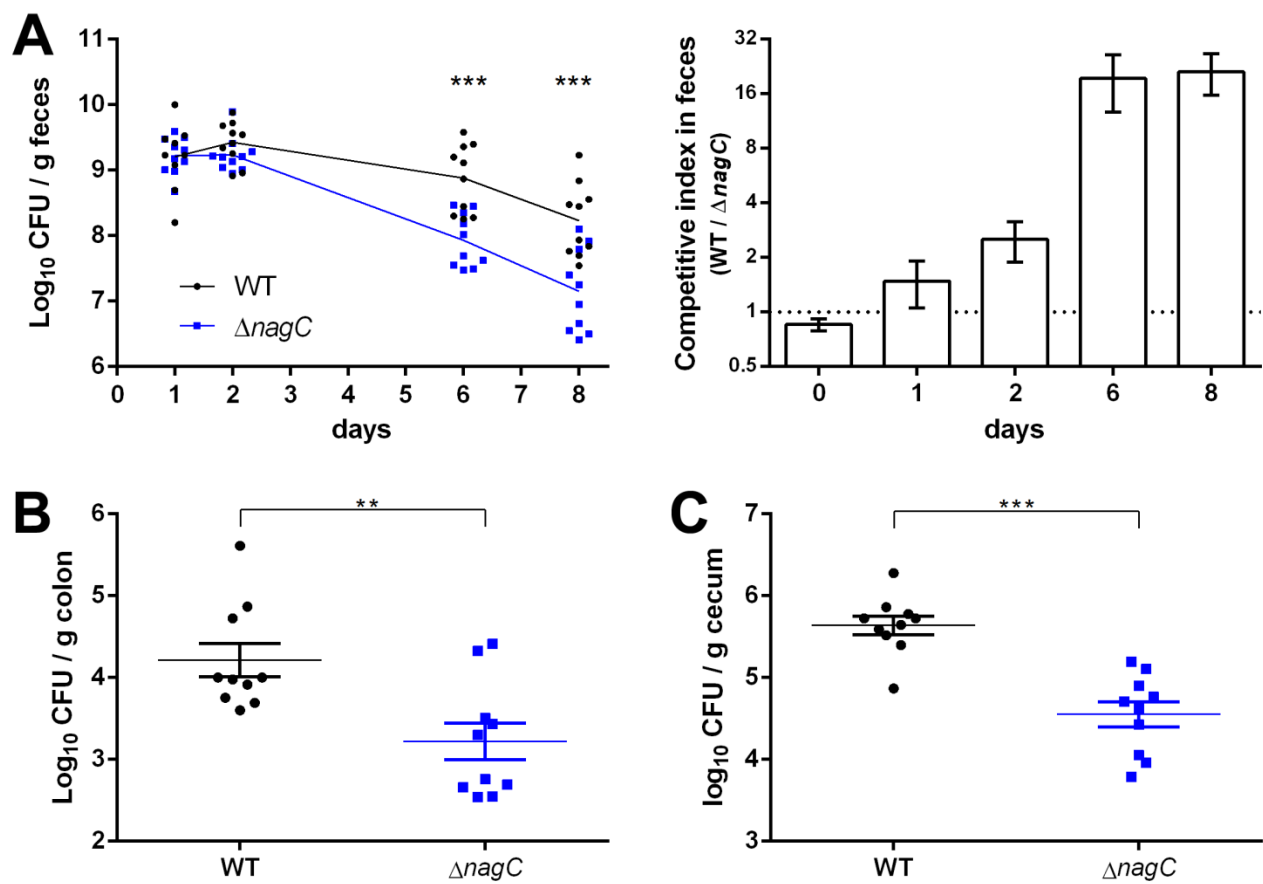


Figure 6

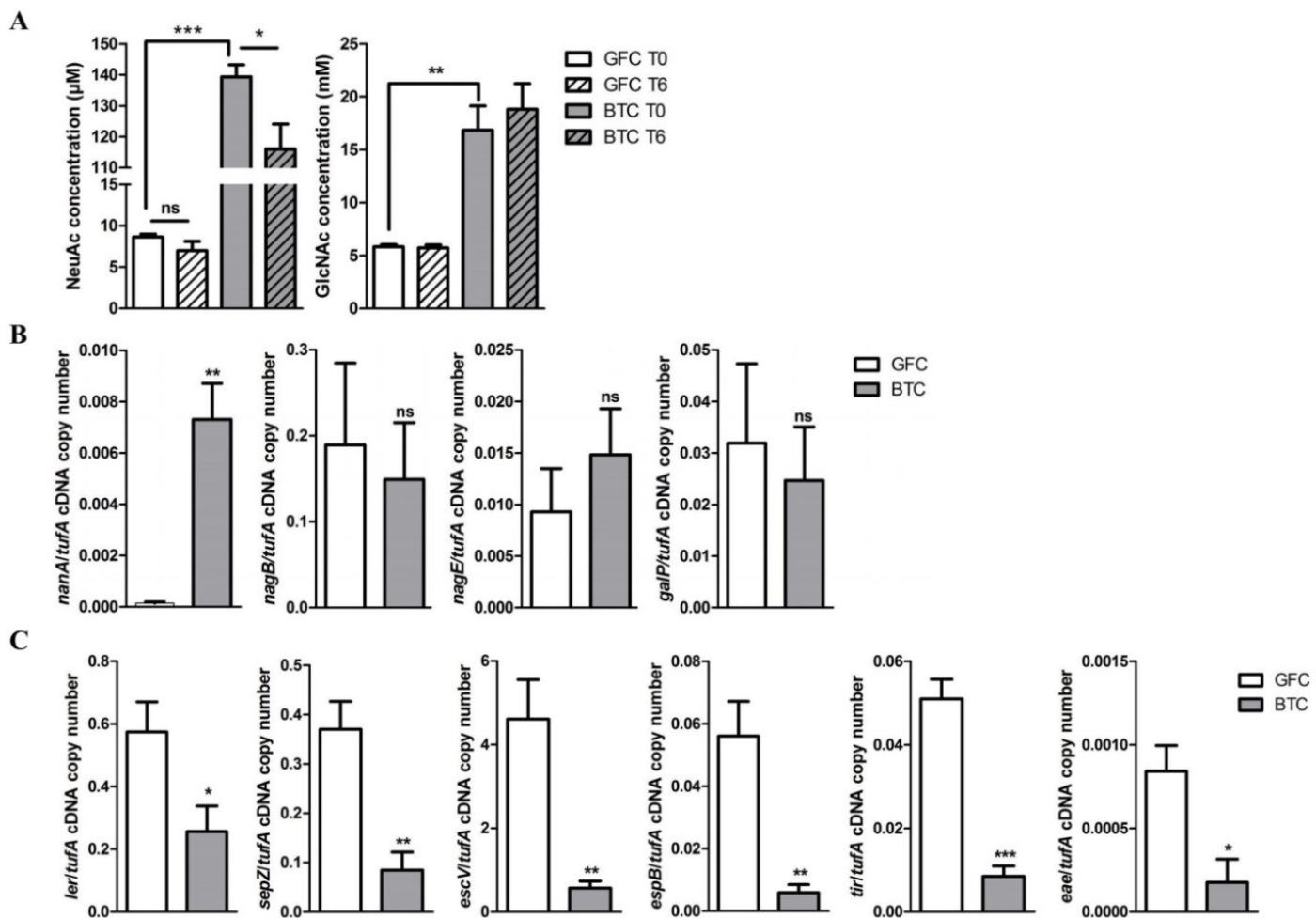


Figure 7

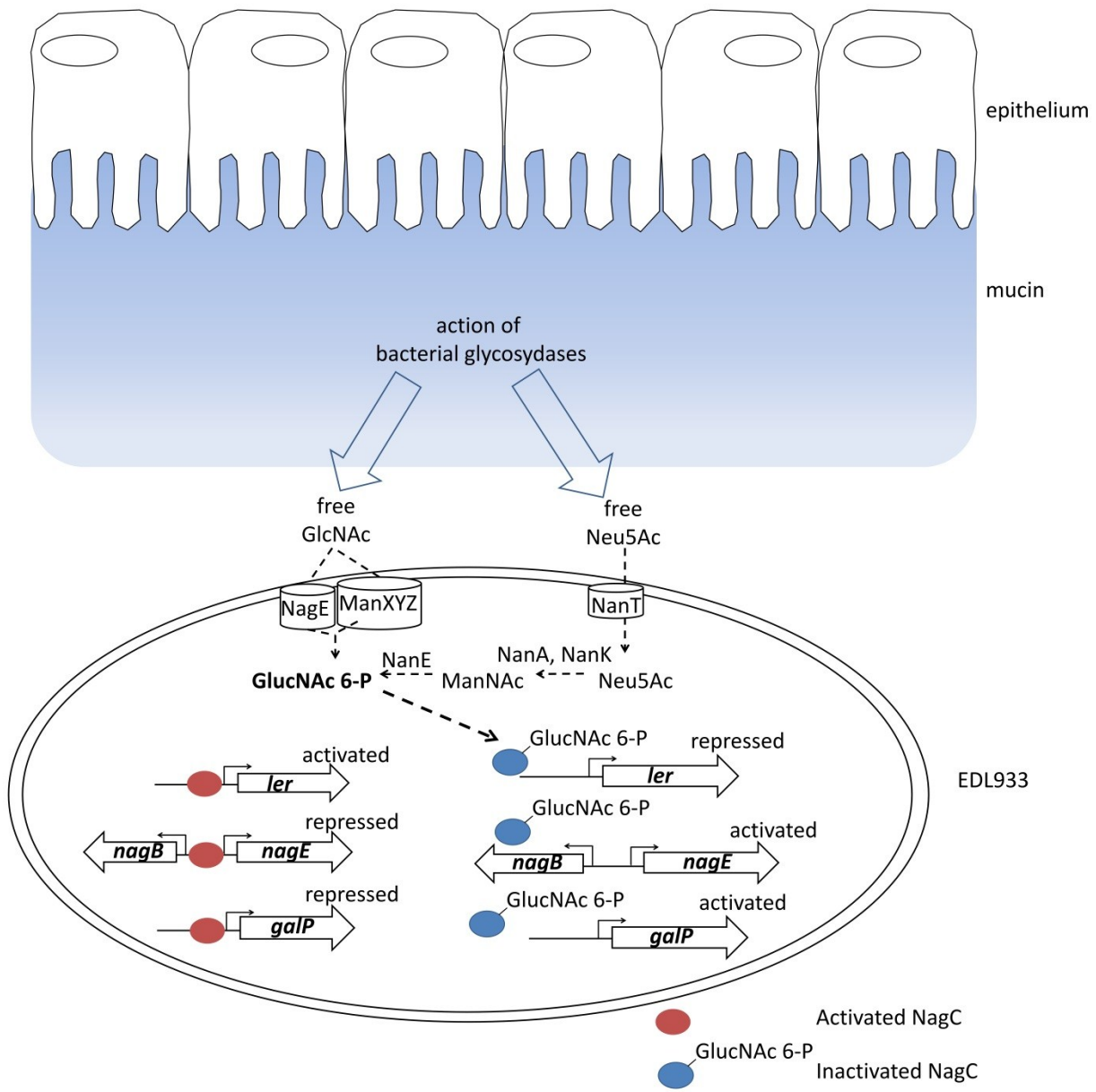


Figure 8

2.8. Supporting information

Supplementary table 1: Bacterial strains and plasmids

Strains	Relevant characteristics	References
EDL933	wild type EHEC O157:H7	[248]
<i>ΔnagC</i>	EDL933 <i>ΔnagC</i> KanR	This work
<i>ΔnanR</i>	EDL933 <i>ΔnanR</i> KanR	This work
χ7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 glnV44 fhuA21 lacY1 recA1 RP4-2-Tc::Mu λpir ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10</i>	[249]
<i>B. thetaiotaomicron</i>	Wild type strain VPI-5482 (ATCC29148) isolated from a healthy adult human	[217]
Plasmids		
pGEM@-T	Cloning vector	Promega
pMEG-375	Suicide vector <i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> ; CmR ApR	R. Curtiss III, ASU
pTrc99a	expression vector with IPTG inducible <i>lacI</i> promoter; ApR	[250]
<i>pnagC</i>	pTrc99a:: <i>nagC</i> ; ApR	This work
pRS551	<i>lacZ</i> reporter gene fusion plasmid; ApR kmR	[251]
pGLB1	pRS551 containing the intergenic region between <i>ler</i> and <i>espG</i> (bp-1225 to +19)	This work

1. O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB (1983) *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. Lancet 1: 702.
2. Roland K, Curtiss R, 3rd, Sizemore D (1999) Construction and evaluation of a delta *cyA* delta *crp* *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. Avian Dis 43: 429-441.
3. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, et al. (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. Science 299: 2074-2076.
4. Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. Gene 69: 301-315.

5. Simons RW, Houtman F, Kleckner N (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53: 85-96.

Supplementary table 2: list of primers used in this study

Name	Sequence 5' → 3'	Use
<i>tufA</i> -For	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	mRNA quantification
<i>tufA</i> -Rev	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	
<i>rpoA</i> -For	AGCGTATTGCCTACAATGTT	mRNA quantification
<i>rpoA</i> -Rev	CATCACGTAAGTCAACGAAA	
<i>ler</i> -For	AGTTCTACAGCAGGAAGCAA	mRNA quantification
<i>ler</i> -Rev	TTGCGGTAGTAAACACCTTT	
<i>espB</i> -For	AGGTTGCAAATAAAGCTCTG	mRNA quantification
<i>espB</i> -Rev	GCAAGATCTTCAGCAAAGTC	
<i>sepZ</i> -For	ATGGAAGCAGCAAATTTAAG	mRNA quantification
<i>sepZ</i> -Rev	AGCCGTAGTGGTAAGTGCTA	
<i>escV</i> -For	AGAAAACCTTGCAGGTGATA	mRNA quantification
<i>escV</i> -Rev	CCTTATTATTGCCAGTTCCA	
<i>tir</i> -For	TACAGGTCTGATAGGGTTGG	mRNA quantification
<i>tir</i> -Rev	TTTGATTATCTGGGTCTGG	
<i>eae</i> -For	GTTCTGTCGAATGGTCAAGT	mRNA quantification
<i>eae</i> -Rev	TTGCAGTTCCTGAAACAATA	
<i>gadE</i> -For	AAAATCAATTCCTGTCAGA	mRNA quantification
<i>gadE</i> -Rev	ATGTGATAAGGTGCCAAAAC	
<i>nanA</i> -For	TATCGGGCAATTATTGATTC	mRNA quantification
<i>nanA</i> -Rev	ATCTGATAGAGATCGCCAGA	
<i>nagE</i> -For	GTACTGGCGGGTATCATTAC	mRNA quantification
<i>nagE</i> -Rev	GCCAGACGTAACCAAAAAT	
<i>nagB</i> -For	CCAATGACCACCTATAAAGC	mRNA quantification
<i>nagB</i> -Rev	CGTTGAGAAGGTTGATGTTT	
<i>manX</i> -For	GCGGATACTGTTGTAAGAC	mRNA quantification
<i>manX</i> -Rev	CATCTGTTGGGTTGGTAAAT	
<i>galP</i> -For	ACGTACTTGCCACCTTTATC	mRNA quantification
<i>galP</i> -Rev	GACAATAAACATCAGCAGCA	
<i>z2210</i> -For	AACTGAAGAAAAACGGACAG	mRNA quantification
<i>z2210</i> -Rev	GTCATAATTACCGGTTGAA	
<i>nagC</i> -For	AATTGGCCATATTCAGGTC	mRNA quantification
<i>nagC</i> -Rev	TGCAGATAGTTTTGATGGTG	
<i>nagD</i> -For	GTTTTATACCTCTGCGATGG	mRNA quantification
<i>nagD</i> -Rev	ATCATGTCCCAGTTGTAGGA	
<i>chbC</i> -For	AATCCC GGCTTTATTATTC	mRNA quantification

<i>chbC</i> -Rev	AGCAGTGGAAACAAAGATCAC	
<i>AscI-nagC</i> -For	AGGCGCGCCTACCGCGCCCGTGGGTGTCCG	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -amont-Rev	TGTGCTTTTATAGTGGCGCTTATTGTTGTC	Construction of <i>nagC</i> mutant
H2P2- <i>nagC</i> -For	AGCGCCACTATAAAAGCACAtgtaggctggagctgctcg	Construction of <i>nagC</i> mutant
H1P1- <i>nagC</i>	GTA ACTCAATAAGAGAAAGTattccgggatccgctcgacc	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>SacI-nagC</i> -Rev	CGAGCTCGGCGATGCCGTATATTACCGG	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -aval-For	ACTTTCTCTTATTGAGTTACGACCTCGTTA	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>AscI-nanR</i> -For	AGGCGCGCCTCAATAATTGCCCGATAGTGA	Construction of <i>nanR</i> mutant
<i>nanR</i> -amont-Rev	TGCCACTTTAGTGAAGCAGATCGCATTATA	Construction of <i>nanR</i> mutant
H2P2- <i>nanR</i> -For	TCTGCTTCACTAAAGTGGCAtgtaggctggagctgctcg	Construction of <i>nanR</i> mutant
H1P1- <i>nanR</i> -Rev	AATCACACTGACCTTACAGAAattccgggatccgctcgacc	Construction of <i>nanR</i> mutant
<i>SacI-nanR</i> -Rev	CGAGCTCGACCAGACACCGCACATCATC	Construction of <i>nanR</i> mutant
<i>nanR</i> -aval-For	TCTGTAAGGTCAGTGTGATTAACATCATCA	Construction of <i>nanR</i> mutant
<i>nanR</i> -comp-Rev-BamHI	CGAGCTCGTGATGATGTTAATCACACTG	<i>nanR</i> mutant complementation
<i>nanR</i> -comp-For-SacI	CGGGATCCCGTAATGCGATCTGCTTCACTA	<i>nanR</i> mutant complementation
<i>nagC</i> -comp-For-SacI	CGAGCTCGTAACGAGGTCGTA ACTCAAT	<i>nagC</i> mutant complementation
<i>nagC</i> -comp-Rev-BamHI	CGGGATCCCGGCGCCACTATAAAAGCACAT	<i>nagC</i> mutant complementation
Plee1-For	CGGGATCCATAGCATCATATAGTGCAA	Plee1- <i>lacZ</i> transcriptional fusion
Plee1-Rev	CGGGATCCGCTTTAATATTTTAAGCTAT	Plee1- <i>lacZ</i> transcriptional fusion

Section IV- Discussion - Conclusions

1. Discussion

Le présent projet de doctorat a consisté à étudier l'adaptation générale d'une souche EHEC à l'activité métabolique du microbiote intestinal humain et à caractériser les mécanismes de régulation microbiote-dépendants des gènes de virulence. Les EHEC sont des pathogènes ayant la capacité à coloniser transitoirement l'intestin humain en causant la maladie et à se maintenir dans le tractus intestinal bovin. Ceci implique une adaptation du pathogène au microbiote intestinal du point de vue métabolique ainsi qu'une expression optimale des gènes de virulence. Le microbiote intestinal, et plus particulièrement *B. thetaiotaomicron*, influence l'expression des gènes de virulence des EHEC par des mécanismes de régulation qui demeurent méconnus et qui doivent être caractérisés [184].

Par une approche transcriptomique globale, appuyée par une analyse de métabolomique ciblée, nous avons dans un premier temps décrit le profil transcriptomique de la souche EHEC O157:H7 EDL933 incubée dans le contenu cécal de rats conditionné par le microbiote intestinal humain. Le modèle expérimental a consisté en la culture *in vitro* de EDL933 dans le contenu cécal de rats axéniques (milieu GFC) et dans celui de rats colonisés par le microbiote intestinal humain (milieu HMC). L'effet de l'activité métabolique du microbiote intestinal sur le pathogène a été mis en évidence en comparant le transcriptome de la souche cultivée dans le HMC avec celui de la même souche cultivée dans le GFC. Ce travail nous a permis d'identifier les voies métaboliques différenciellement exprimées en réponse au microbiote intestinal et à dresser le profil métabolique du pathogène résultant de son adaptation métabolique au microbiote. Nos données montrent que l'activité métabolique du microbiote intestinal induit une réponse en carence en nutriments chez EDL933, qui se traduit par une transition d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme anaplérotique ainsi que par une diminution de la concentration de plusieurs nutriments dans le HMC. Une analyse détaillée a permis l'identification des voies

métaboliques différenciellement exprimées contribuant à l'adaptation de EDL933 au HMC. De plus, nous avons montré que le microbiote intestinal, et plus particulièrement *B. thetaiotaomicron*, induit la répression de l'expression de plusieurs gènes du LEE et de gènes codant pour des effecteurs sécrétés par le SST3.

L'identification des facteurs intestinaux répresseurs de l'expression des gènes de virulence des EHEC est d'un intérêt majeur. Nous avons identifié deux composés répresseurs des gènes du LEE, le NeuAc et le GlcNAc, dont la concentration intestinale est augmentée *in vivo* chez le rat par *B. thetaiotaomicron*. Le mécanisme de répression des gènes du LEE en réponse au Neu5Ac et au GlcNAc implique le régulateur transcriptionnel NagC que nous avons identifié comme un activateur de l'expression de *ler*. Le régulateur NagC étant un régulateur du catabolisme du GlcNAc et du galactose, ce travail caractérise un nouveau mécanisme de coordination du métabolisme avec la virulence chez les EHEC.

1.1. Modèle expérimental pour l'étude de l'effet du microbiote

Dans ce présent travail, l'étude de l'adaptation transcriptionnelle de EDL933 au microbiote intestinal a été réalisée à partir de cultures du pathogène dans le GFC et le HMC. Comme tout modèle, ce dernier possède ses avantages et ses limites.

Notre étude propose une culture de la souche EDL933 dans le GFC et le HMC qui sont des milieux stériles conditionnés soit par l'hôte uniquement (GFC), soit par l'hôte et le microbiote intestinal (HMC). Par cette approche, nous étudions l'adaptation d'EDL933 au métabolome du milieu intestinal et excluons les interactions directes avec le microbiote.

Notre modèle expérimental permet l'étude du transcriptome d'EDL933 en réponse aux changements du métabolome intestinal provoqués par l'activité du microbiote. Du point de vue technique, la monoculture apporte l'avantage de pouvoir récolter les ARNm du pathogène en s'affranchissant de la présence des ARNm du microbiote. Ceci rend alors possible l'utilisation de puces à ADN ainsi que la réalisation de qRT-PCR pour l'étude des voies métaboliques différentiellement exprimées chez le pathogène en réponse au microbiote. Il est alors permis d'avoir une vue d'ensemble de l'adaptation du pathogène à l'activité métabolique du microbiote pour envisager des expériences plus ciblées en utilisant un modèle plus réaliste. Par la suite, l'impact de l'inactivation par mutagenèse dirigée de gènes d'intérêt peut être étudié dans des conditions définies ou bien *in vivo* dans un modèle animal possédant un microbiote intestinal.

La limite de notre modèle est l'absence du microbiote intestinal lors de la culture d'EDL933 ce qui peut induire un biais expérimental lié à l'absence d'interactions directes entre le microbiote et le pathogène. Effectivement, la présence du microbiote intestinal exerce une dynamique durant laquelle il y a, en temps réel, consommation de nutriments et de relâche de produits métaboliques. Du point de vue du pathogène, cela se traduit par une compétition en tant réelle pour les nutriments ainsi qu'un approvisionnement constant en substrats secondaires produits par le microbiote. Il est envisageable que cela puisse se refléter du point de vue transcriptionnel par une différence de niveau d'expression de certaines voies métaboliques chez le pathogène. Cependant, la dynamique existante entre le pathogène et le microbiote est probablement elle-même très variable rendant difficilement imaginable, en plus des difficultés techniques, une étude transcriptomique en présence du microbiote. Par conséquent, l'étude transcriptomique d'EDL933 dans les contenus caecaux stérilisés par filtration demeure un modèle à favoriser pour étudier l'influence du microbiote.

1.2. Réactions anaplérotiques induites en réponse à l'activité du microbiote intestinal

L'expression différentielle d'une importante quantité de gènes impliqués dans le métabolisme de EDL933 dans le HMC par rapport au GFC, indique l'adaptation de la souche à l'activité du microbiote intestinal humain. Cette adaptation se traduit par une inhibition de la voie de la glycolyse et de plusieurs voies associées et une induction du cycle TCA et de plusieurs voies de catabolisme de substrats néoglucogéniques dans le HMC (Article 1, Figure 1 et Tableau 1). Ces changements métaboliques reflètent une transition d'un métabolisme glycolytique dans le GFC vers un métabolisme anaplérotique dans le HMC. Comparé à celui du GFC, le profil métabolique de EDL933 dans le HMC est indicateur d'une carence en nutriments rencontrée par le pathogène. La diminution de la concentration de plusieurs nutriments, tel le lactose, le ribose, le Neu5Ac, le lactate et l'éthanolamine indique la stringence en nutriments induite par le microbiote intestinal (Article 1, Figure 3). Dans le GFC le lactose, substrat glycolytique, est en forte concentration (2.98 mM) et est consommé par EDL933, alors que dans le HMC sa concentration est fortement diminuée (0.2 mM) et le composé n'est plus utilisé par le pathogène (Article 1, Figure 3).

Les réactions anaplérotiques représentent l'ensemble des réactions enzymatiques, ou voies métaboliques, dont le rôle est d'alimenter le cycle TCA en intermédiaires métaboliques [252]. Généralement, ces voies métaboliques correspondent aux voies d'utilisation des substrats néoglucogéniques tels que les acides aminés, les peptides, le lactate et autres composés dont la dégradation mène à la formation d'intermédiaires du cycle TCA (pyruvate, succinate, fumarate...). L'expression de plusieurs voies métaboliques impliquées dans la dégradation des substrats néoglucogéniques est activée dans le HMC et montre la nécessité de EDL933 d'alimenter le cycle TCA pour la production d'énergie. Il a été démontré que le cycle TCA et les voies d'utilisation des acides aminés et des petits peptides

contribuent au fitness des UPEC *in vivo* chez la souris [253]. Chez *E. coli* K12 MG1655, les voies de la néoglucogénèse ainsi que le cycle TCA sont indispensables à la colonisation intestinale des souris traitées à la streptomycine [254]. Cependant, en utilisant le même modèle, il a été montré que la voie de la néoglucogénèse est importante pour la colonisation intestinale des EHEC en compétition avec *E. coli* K12 [7]. De même, la dégradation des substrats néoglucogéniques semble importante pour le maintien des EHEC dans le BSIC (Bovine small intestinal content) [6]. Chez *Salmonella enterica* une délétion des gènes du cycle TCA responsables de la conversion du succinate en furamate rend le pathogène avirulent *in vivo* chez la souris [255].

À la vue de l'importance des substrats néoglucogéniques pour la colonisation intestinale des EHEC, l'identification des ces derniers est d'un intérêt majeur pour prévenir les infections. Dans le HMC, les voies d'utilisation des acides aminés (tryptophane, phenylalanine et leucine), du Neu5Ac, des composés aromatiques (3-hydroxyphenylpropionic acid (3HPP) et 3-hydroxycinnamic acid (3HCI)), du propionate et du lactate sont activées (Article 1, Tableau 1). Ces données indiquent que ces substrats ont un rôle potentiel à jouer dans l'adaptation des EHEC à l'activité métabolique du microbiote intestinal humain. L'expression de *tnaA* codant pour la tryptophanase est fortement induite dans le HMC et corrèle avec une disparition du tryptophane dans le milieu après croissance de EDL933 (Article 1, Figure 3). Ceci indique que le tryptophane, présent à une concentration de 300 μM dans le HMC, est consommé par EDL933 en réponse à l'activité métabolique du microbiote intestinal humain. Le tryptophane n'est en revanche pas utilisé par EDL933 dans le GFC (Article 1, Figure 3). Le gène *tnaA* est également activé dans le BSIC chez EDL933 mais la concentration du tryptophane est inférieure à 15 μM ce qui rend peu probable son utilisation par le pathogène [6]. D'autre part, l'activation de *nanA*, codant pour la N-acetylneuraminase lyase ne corrèle pas avec une diminution de la concentration en Neu5Ac dans le HMC. Ceci peut s'expliquer par la faible concentration en Neu5Ac dans le HMC (8.6 μM) (Article 1, Figure 3). De même, *nanA* est activé dans le BSIC où le

Neu5Ac se trouve en faible concentration (90 μM) et est faiblement consommé par EDL933 [5]. L'activation de l'expression du gène *lldP* requis pour le transport du lactate suggère que le composé est utilisé comme substrat néoglucogénique dans le HMC (Article 1, Tableau 1). Ceci est toutefois difficile à affirmer d'après les données de spectrométrie de masse étant donné que le lactate est produit par EDL933 *in vitro* dans le GFC et le HMC (Article 1, Figure 3). Plusieurs autres voies d'utilisation des composés néoglucogéniques sont activées dans le HMC dont celles du catabolisme du propionate, des composés aromatiques et du transport de la leucine et de la phenylalanine (Article 1, Tableau 1). La pertinence chez l'animal des voies métaboliques identifiées dans ce présent travail nécessite cependant d'être mise en évidence avec de la mutagenèse dirigée et des expériences de colonisation *in vivo*.

Cette approche transcriptomique représente un premier support pour de futures expérimentations visant à identifier les composés et les voies métaboliques permettant aux EHEC de se multiplier et de persister dans l'environnement intestinal mammifère.

1.3. Le microbiote intestinal réprime l'expression des gènes de virulence des EHEC

L'expression de plusieurs gènes de virulence impliqués dans la formation des lésions A/E est réprimée en réponse à l'activité métabolique du microbiote intestinal (Article 1, Tableau 1). Ces gènes incluent plusieurs gènes du LEE ainsi que de nombreux gènes codant pour des effecteurs sécrétés par le SST3. De nombreux composés intestinaux régulent la virulence des EHEC. L'éthanolamine, qui est un composé utilisé comme source d'azote par les EHEC est un composé activateur des gènes du LEE [116,210]. L'éthanolamine est présent dans le GFC à une concentration de 7.9 μM et est non-détectable dans le HMC indiquant sa consommation par le microbiote intestinal humain (Article 1, Figure 3). De plus, la

dégradation du tryptophane par *E. coli* mène à la production d'indole qui est un métabolite répresseur des gènes du LEE à haute concentration [236]. Par conséquent, nos résultats démontrent que le microbiote intestinal modifie la concentration de certains composés régulateurs de la virulence des EHEC. Plus spécifiquement, la disparition de l'éthanolamine et la consommation du tryptophane par EDL933 en réponse à l'activité de microbiote, sont susceptibles d'être impliquées dans la répression des gènes du LEE dans le HMC. Basé sur ces observations, des analyses plus approfondies sont requises afin de déterminer la pertinence *in vivo* du rôle de l'éthanolamine et du tryptophane dans la régulation des gènes impliqués dans la formation des lésions A/E chez les EHEC.

En utilisant une approche expérimentale similaire, l'étude de de Sablet *et al.* démontre que le microbiote intestinal humain associé au rat induit la répression RecA-dépendante des gènes *stx* codant pour la Shiga toxine 2 portés par le phage BP933W chez EDL933 [184]. Cette répression serait induite par la production d'un composé de taille inférieure à 3 kDa et les auteurs identifient *B. thetaiotaomicron*, espèce prédominante du microbiote intestinal humain, comme l'espèce induisant la plus forte répression des gènes *stx* parmi les différentes espèces testées [184]. Afin d'étudier plus spécifiquement l'effet de *B. thetaiotaomicron* sur la virulence de EDL933, nous avons analysé l'expression de plusieurs gènes du pathogène dans le contenu cécal de rats mono-associés avec *B. thetaiotaomicron* (milieu BTC). Contrairement à l'étude précédente de Sablet *et al.* [184], l'analyse de nos données n'indique pas de répression des gènes *stx* ni dans le HMC ni dans le BTC. Une différence dans le mode opératoire peut possiblement expliquer cette différence de résultat. Alors que nos cultures d'EDL933 ont été réalisées en condition statique dans le GFC et le HMC, celles de de Sablet *et al.* [184] ont été réalisées sous agitation. Or, la tension en oxygène est un paramètre important pour l'expression des facteurs de virulence chez les pathogènes entériques. En condition anaérobie, le régulateur Fnr active chez *Salmonella* l'expression des gènes du SPI-1 impliqués dans le processus d'invasion des cellules intestinales [256]. Chez *Shigella*, Fnr réprime la sécrétion

de type III. Cette répression est levée à proximité de la muqueuse intestinale où *Shigella* rencontre l'oxygène diffusant à partir des capillaires sanguins [257]. Enfin, l'adhérence et la sécrétion de type III des EHEC aux cellules épithéliales du colon humain est augmentée en condition microaérobie par rapport à la condition aérobie [258]. L'ensemble de ces observations souligne la complexité de la régulation de la virulence des pathogènes entériques et l'importance du choix des conditions expérimentales.

Tandis que les gènes *stx* ne sont pas différentiellement exprimés dans le HMC avec nos conditions expérimentales, les gènes impliqués dans les lésions A/E sont réprimés. Alors que les gènes du LEE sont modérément réprimés dans le HMC, ils le sont fortement dans le BTC indiquant la capacité de l'espèce *B. thetaiotaomicron* à réprimer la virulence des EHEC. L'analyse de l'expression de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la pathogénèse des EHEC montre que le microbiote intestinal et *B. thetaiotaomicron* affectent spécifiquement les gènes associés aux lésions A/E. Ces premières données indiquent que *B. thetaiotaomicron* relâche *in vivo* des composés inhibiteurs des gènes du LEE ou bien consomme des composés activateurs. En favorisant l'idée de la relâche de composés inhibiteurs, nous avons criblé plusieurs composés intestinaux pour détecter les inhibiteurs de l'expression des gènes du LEE dans des conditions où ces derniers sont induits (Annexe 1, Figure 1).

1.4. Rôle du catabolisme du Neu5Ac et le GlcNAc et de NagC dans la régulation de la virulence des EHEC

En utilisant la fusion transcriptionnelle plasmidique PLEE1-*lacZ* nous avons mesuré l'activité du promoteur de *ler*, activateur majeur des gènes du LEE, lors de l'incubation d'EDL933 en milieu DMEM supplémenté ou non avec des nutriments intestinaux (acides aminés, carbohydrates, composés aromatiques, AGV). Ces composés ont été sélectionnés selon l'identification des voies

métaboliques différemment exprimées chez EDL933 dans le HMC et le BTC par rapport au GFC.

Nous avons identifié le Neu5Ac comme un composé répresseur de l'activité β -galactosidase issue de notre construction génétique et répresseur de l'expression de l'ensemble des opérons du LEE, de la sécrétion de type III et de l'adhésion sur cellules HeLa (Article 2, Figure 1 et 2). Puisque le catabolisme du Neu5Ac modifie l'activité des deux régulateurs transcriptionnels, NanR et NagC, nous avons analysé l'influence de ces régulateurs sur l'expression des gènes du LEE. Nous avons identifié NagC comme un activateur des gènes du LEE et montré que la répression induite par le Neu5Ac était NagC-dépendante (Article 2, Figure 3). Comme le catabolisme du Neu5Ac et du GlcNAc affecte l'activité du même régulateur NagC (Figure 1), nous nous sommes intéressés à l'influence du GlcNAc sur la régulation des gènes du LEE. De façon similaire, nous avons identifié le GlcNAc comme un composé répresseur des gènes du LEE en milieu DMEM (Article 2, Figure 1). De plus, nous avons exclu le rôle du régulateur NanR dans la régulation des gènes du LEE (Article 2, Figure 3).

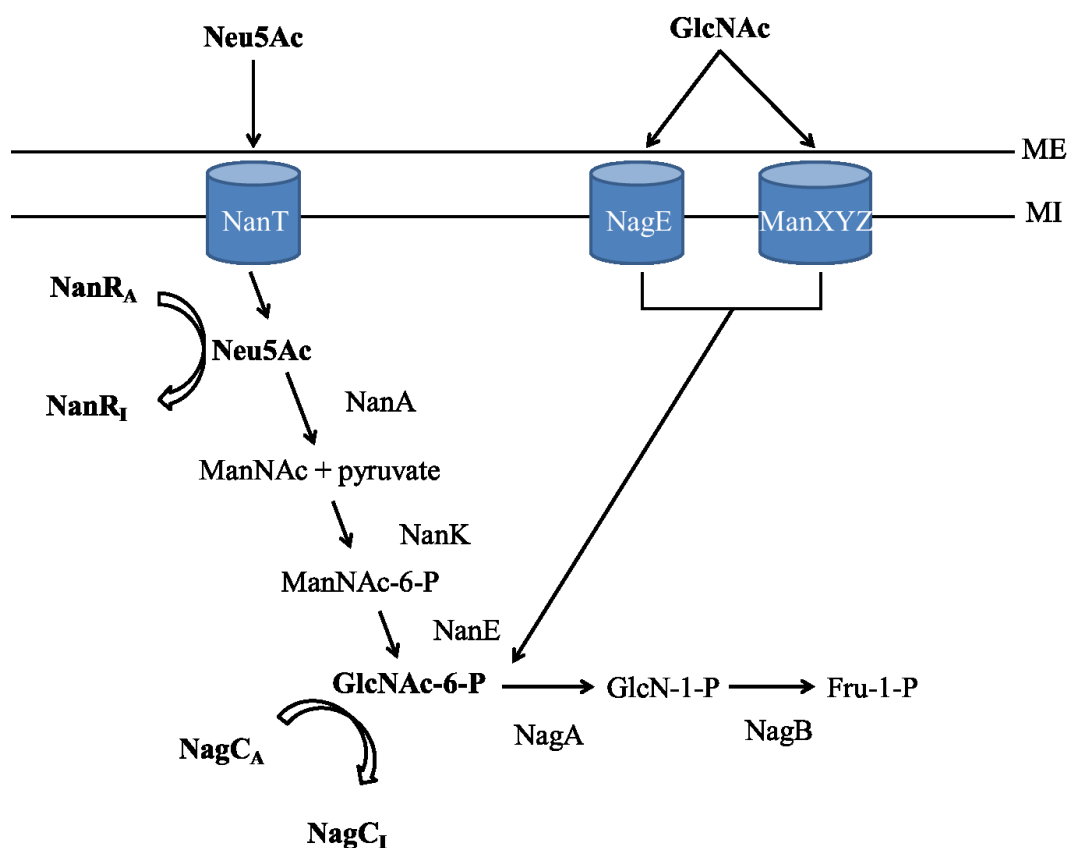


Figure 1. Représentation schématique des voies de catabolisme du Neu5Ac et du GlcNAc. Le Neu5Ac franchi la membrane interne d'*E. coli* via le transporteur NanT, alors que le GlcNAc est transporté par la perméase NagE ou bien par le système ManXYZ. Le GlcNAc-6-P est généré par le catabolisme du Neu5Ac via l'action des enzymes NanA, NanK et NanE ou bien directement par le transport du GlcNAc qui induit la phosphorylation du composé par un système de phosphotransfert. Les régulateurs transcriptionnels NanR et NagC sont inactivés en présence de Neu5Ac et de GlcNAc-6-P respectivement. ME = membrane externe; MI = membrane interne, A = actif, I = inactif.

1.4.1. Origine du Neu5Ac et du GlcNAc

Le Neu5Ac et le GlcNAc sont des sucres intestinaux retrouvés sous forme associée à la mucine intestinale (Figure 2) ou bien sous forme soluble dans le contenu intestinal [5,208]. Le Neu5Ac est également un composé de la capsule de

certaines bactéries et le GlcNAc est un élément structural du peptidoglycane chez les bactéries [259]. Dans le BSIC, le Neu5Ac et le GlcNAc sont retrouvés sous forme soluble à une concentration de 0.09 mM et 0.89 mM respectivement [5]. Par spectrométrie de masse, nous avons mis en évidence la présence du Neu5Ac et du GlcNAc solubles dans le contenu cécum des rats et nous avons montré que *B. thetaiotaomicron* induisait la relâche de ces composés dans l'intestin des rats *in vivo*. Alors que dans le GFC le Neu5Ac et le GlcNAc sont à une concentration de 8.6 μ M et 5.8 mM cette dernière grimpe à 139.3 μ M et 16.8 mM dans le BTC (Article 2, Figure 5). En ce qui concerne le Neu5Ac, nos données confirment les observations réalisées par Ng *et al.* [209] qui démontrent que *B. thetaiotaomicron* mono-associé aux souris induit une augmentation de la concentration intestinale de Neu5Ac *in vivo*. De plus, les auteurs montrent que la libération du Neu5Ac est dépendante de l'activité d'une seule sialidase codée par le génome de *B. thetaiotaomicron* [209]. En revanche, c'est la première fois que le rôle de *B. thetaiotaomicron* dans la relâche du GlcNAc *in vivo* est mis en évidence. De ce fait, nos résultats montrent que *B. thetaiotaomicron* est capable de relâcher *in vivo* le Neu5Ac et le GlcNAc qui sont des composés répresseurs de la virulence des EHEC. *B. thetaiotaomicron* est une bactérie spécialisée dans la dégradation des polysaccharides et qui produit pour cela un arsenal de glycosidases dont la N-acetylglucosaminidase et la neuraminidase [217,260]. Néanmoins, le microbiote intestinal étant caractérisé par une importante redondance fonctionnelle entre les différentes espèces bactériennes, nous pouvons envisager que d'autres espèces aient le même effet que celui de *B. thetaiotaomicron* [261]. Parmi les espèces produisant des sialidases et des N-acetylglucosaminidases, nous retrouvons plusieurs espèces de l'embranchement des *Bacteroidetes* (*B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides. vulgatus*), des *Firmicutes* (*Clostridium cocleatum*, *Clostridium septicum*, *Ruminococcus torques*), des *Verrucomicrobia* (*Akkermansia muciniphila*) ainsi que des pathogènes de l'embranchement des *Proteobacteria* [262].

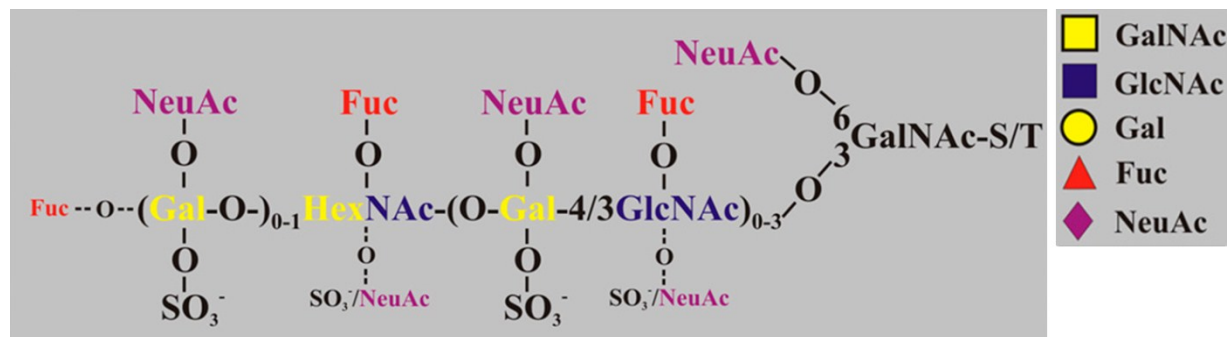


Figure 2. Représentation schématique de la structure des oligosaccharides retrouvés dans le colon humain. Selon Johansson *et al.* [263]. La structure de mucine présentée est basée sur une structure de base de type 3. Les positions les plus courantes des différents constituants sont indiquées avec des lettres larges alors que les positions les moins courantes sont indiquées avec des petites lettres. GalNAc pour N-acetylgalactosamine, GlcNAc pour N-acetylglucosamine, Gal pour galactose, Fuc pour fucose et NeuAc pour N-acetylneuraminic acid. La mucine est également sulfatée (SO₃⁻).

1.4.2. NagC coordonne la virulence avec le métabolisme

Avant d'être un régulateur de la virulence, NagC est avant tout un régulateur du catabolisme du GlcNAc et du galactose chez *E. coli* K12 [264,265]. NagC est un inhibiteur de *nagE* codant pour la perméase du N-acétylglucosamine et de l'opéron *nagBACD* codant les enzymes de dégradation du N-acetylglucosamine et pour le régulateur NagC lui-même [264]. NagC est également un inhibiteur de *galP* codant pour le transporteur du galactose [265]. Dans ce travail, nous avons validé le rôle de NagC en tant que répresseur des gènes *galP*, *nagB* et *nagE* chez EDL933 (Article 2, Figure 4). Dans ce processus de régulation, le catabolisme du Neu5Ac et du GlcNAc mène à la production de GlcNAc-6-P qui est le signal intracellulaire contrôlant l'activité de NagC [264]. En présence de GlcNAc-6-P, NagC perd sa capacité à lier l'ADN et par conséquent perd sa fonction de régulateur transcriptionnel [264]. Alors que NagC est un inhibiteur des gènes du catabolisme, nous l'avons identifié comme un activateur

des gènes du LEE. Le rôle de NagC comme activateur transcriptionnel a déjà été mis en évidence comme dans le cas de la régulation de *glmU* impliqué dans la synthèse du peptidoglycane ou bien dans le cas de la régulation du gène *fimB* codant pour une recombinaison régulatrice de la production de fimbriae de type I chez *E. coli* [266].

L'identification de NagC comme activateur des gènes du LEE chez EDL933 indique son rôle de coordonnateur du métabolisme et de la virulence chez le pathogène. Lorsque la souche EHEC rencontre des quantités suffisantes de GlcNAc et de Neu5Ac, il y a stimulation du catabolisme du GlcNAc et du galactose et inhibition de l'expression des gènes du LEE, alors qu'en absence de ces composés il y a répression du catabolisme et activation de l'expression des gènes du LEE (Figure 3).

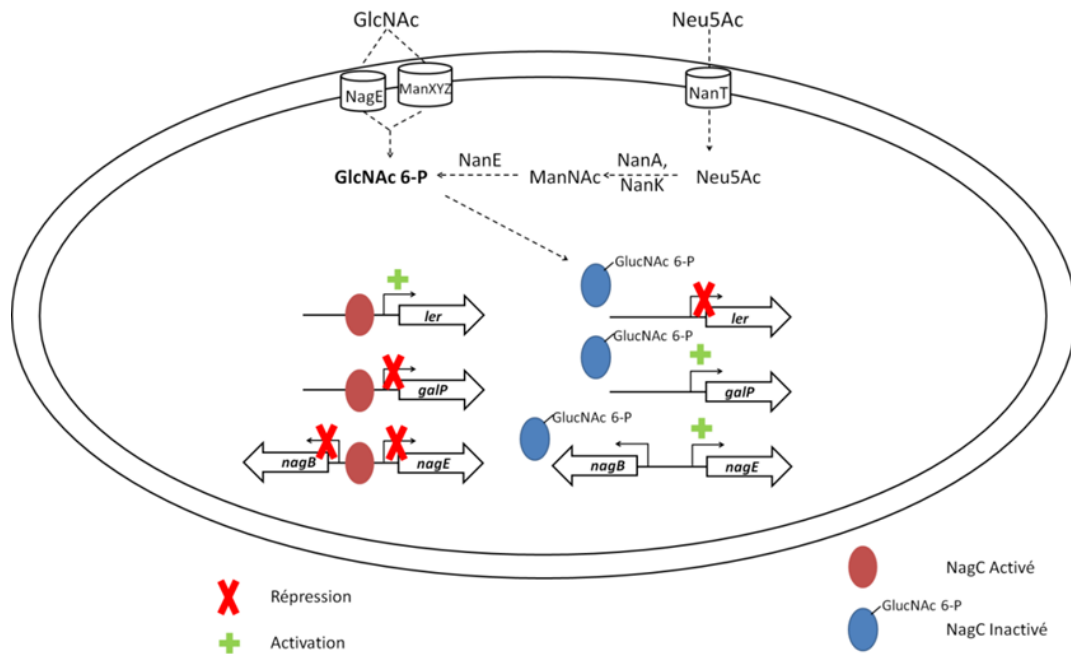


Figure 3. Modèle de régulation de la virulence et du métabolisme par NagC. Le catabolisme du Neu5Ac et le transport du GlcNAc génère du GlcNAc-6-P qui inactive NagC. L'inhibition de la protéine NagC en présence de Neu5Ac et de GlcNAc induit une levée d'inhibition de l'expression des gènes *nagB*, *nagE* et *galP* et la désactivation de l'expression de *ler*. Ceci conduit à l'activation du catabolisme du GlcNAc et du galactose et à l'inhibition de la production du SST3.

1.4.3. Rôle de NagC dans le co-métabolisme des sucres dérivées de la mucine

Il est intéressant de noter que l'incubation d'EDL933 en présence de Neu5Ac stimule le catabolisme du GlcNAc et que le GlcNAc stimule son propre catabolisme ainsi que celui du galactose (Article 2, Figure 4). Ce mécanisme de co-activation induit par NagC n'est pas propre à la souche EHEC utilisée dans cette étude mais est un mécanisme présent chez *E. coli* en général [265]. Placé dans le bon contexte, ce mécanisme de co-activation du catabolisme du GlcNAc et

du galactose en réponse au Neu5Ac et au GlcNAc peut apporter des réponses quant aux stratégies nutritionnelles d'*E. coli* dans l'intestin. Si on se réfère à la Figure 2 et à l'étude de Robbe *et al.* [208], on peut s'apercevoir que la mucine intestinale humaine est constituée en grande partie de GlcNAc, de Neu5Ac et de galactose. La mucine intestinale est également largement fucosylée et sulfatée (Figure 2) [208]. De plus, l'étude de Robbe *et al.* [208] identifie un gradient décroissant de fucose et à l'opposé un gradient croissant de Neu5Ac associé à la mucine intestinale humaine de l'iléum vers le rectum. Ainsi, selon le modèle proposé en Figure 4, il est tout à fait envisageable que *E. coli* exploite le Neu5Ac et le GlcNAc, relâchés de la mucine intestinale par les bactéries symbiotiques pour co-métaboliser le GlcNAc et le galactose. De plus, le catabolisme du Neu5Ac inhibe l'activité du répresseur NanR ce qui lève la répression des gènes *nan* requis pour le catabolisme du Neu5Ac (Figure 4). Plusieurs travaux ont mis en évidence le co-métabolisme des sucres dérivés de la mucine par *E. coli*. Les *E. coli* commensales et pathogènes sont capables de co-métaboliser jusqu'à 9 sucres dérivés de la mucine en priorisant le co-métabolisme du GlcNAc et du galactose [7]. Le GlcNAc, le galactose et le Neu5Ac sont présents dans le BSIC et sont consommés par la souche EHEC O157:H7 EDL933, lui conférant un avantage compétitif par rapport aux bactéries endogènes du bovin [5]. L'ensemble de ces observations nous laisse suggérer que NagC joue un rôle central dans le métabolisme d'*E. coli* en interaction avec les composés issus de la mucine. Renforçant cette hypothèse, nous avons démontré que NagC contrôlait négativement l'expression du gène *z2210* d'EDL933 codant pour une sulfatase (Annexe 1, Figure 1). La mucine intestinale étant hautement sulfatée (Figure 2) [208], cela suggère que NagC contrôle également l'acquisition du sulfate par *E. coli* en contact avec la mucine intestinale.

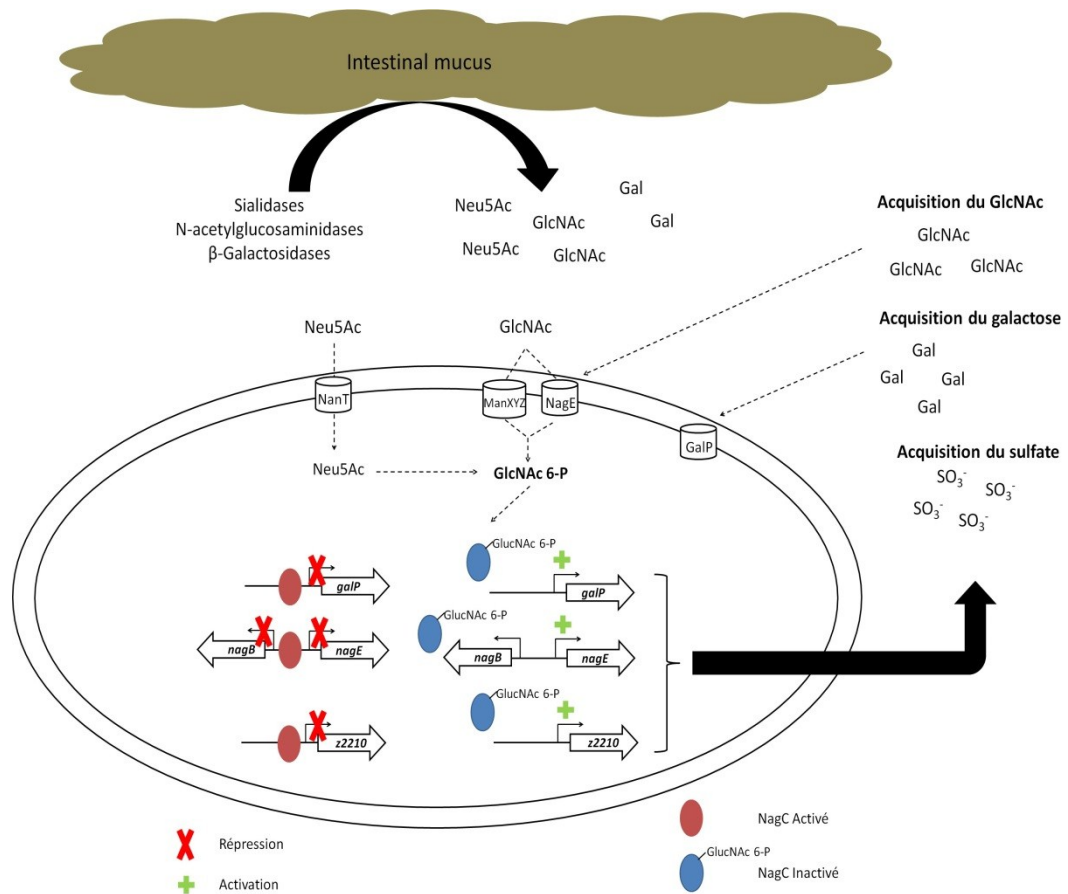


Figure 4. Modèle de régulation du co-métabolisme par NagC chez *E. coli*. L'activité sialidase, N-acetylglucosaminidase et β-galactosidase du microbiote intestinal permet la libération du Neu5Ac, du GlcNAc et du galactose (Gal) dans le milieu intestinal à partir du mucus. L'internalisation du Neu5Ac, via NanT, et du GlcNAc via NagE et ManXYZ génère du GlcNAc-6-P qui inactive NagC. L'inactivation de NagC lève la répression de l'expression de *galP*, *nagE* et *nagB* ainsi que de *z2210*, ce qui stimule l'acquisition du GlcNAc du galactose et du sulfate par *E. coli*.

1.4.4. NagC est-il impliqué dans la répression des gènes du LEE dans le BTC?

Quand bien même le Neu5Ac et le GlucNAc répriment les gènes du LEE dans le milieu défini DMEM (Article 2, Figure 1), et que leur concentration

augmente dans le BTC par rapport au GFC, leur effet répresseur dans le BTC reste incertain (Article 2, Figure 5). Bien que le Neu5Ac soit consommé par EDL933 dans le BTC, cela ne semble pas le cas pour le GlcNAc (Article 2, Figure 5). Les gènes *nagB* et *nagE* n'étant pas différenciellement exprimés dans le BTC par rapport au GFC, ce qui indique une absence de régulation par le régulateur NagC. De plus, la concentration en GlcNAc dans le GFC est de 5.8 mM (Article 2, Figure 5), ce qui est très élevé étant donné que d'après nos expériences en milieu DMEM une répression maximale est observée à 1 mM. Ainsi, bien que nous soyons certains du rôle joué par NagC en milieu défini DMEM, dans le contenu cécal de rat la répression des gènes du LEE semble être associée à un autre mécanisme. Récemment, il a été montré que *B. thetaiotaomicron* induit la répression des gènes du LEE chez les EHEC O157:H7 via la relâche de fucose dérivé de la mucine [117]. Ceci pourrait éventuellement expliquer la répression observée dans le BTC. De toute évidence, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de montrer le rôle de NagC dans la régulation de la virulence des EHEC dans le contenu intestinal mammifère.

1.4.5. Mécanistique de la régulation par NagC

D'après nos expériences menées en milieu défini, NagC est un régulateur transcriptionnel qui peut jouer le rôle d'activateur ou bien de répresseur et dont l'activité régulatrice est inhibée en présence de GlcNAc-6-P intracellulaire [264]. D'après plusieurs études réalisées par l'équipe du Dre Plumbridge, il a été établi que le régulateur NagC reconnaît une séquence de 23 pb, appelée ici « boîte NagC » dont le consensus, déterminé à partir de nos analyse *in silico*, est présenté en Figure 5 [267]. NagC est une protéine qui est présumée agir en dimère et qui requière généralement deux boîtes NagC pour réguler la transcription des gènes comme c'est le cas pour les gènes *nag* et *fimB* [264,267,268]. Cependant, une seule boîte NagC a été mise en évidence au niveau du promoteur de *galP* [265].

Généralement, la régulation transcriptionnelle par NagC fait intervenir la formation de boucles d'ADN comme c'est le cas pour répression de l'expression des gènes *nag* et de *galP* ainsi que pour l'activation de la transcription de *fimB* chez *E. coli* [264,265,268].

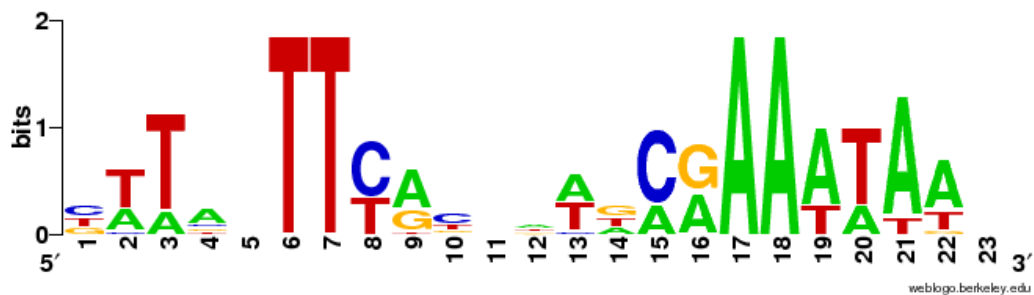


Figure 5. Séquence logo déterminées à partir des sites de fixation de NagC chez EDL933.

Nous avons été en mesure grâce à nos analyses et avec l'aide du Dre Plumbridge d'identifier une séquence potentielle de fixation de NagC sur le promoteur de *ler* (Figure 6). Bien que nous ayons réalisé des expériences d'EMSA et de footprinting suggérant une interaction de la protéine NagC avec le promoteur de *ler*, les résultats préliminaires ne sont pas convaincants et ne permettent pas de conclure quant à une régulation directe médiée par NagC (Annexe 1, Figure 2 et 3). En effet, alors que des concentrations de la protéine NagC de l'ordre du nanomolaire suffisent à observer une protection à la DNase du promoteur des gènes *nagB* et *nagE*, des concentrations supérieures à 1 μ M sont requises afin de voir une protection sur le promoteur de *ler* (Annexe 1, Figure 3). Ceci serait le résultat d'une affinité moindre de NagC avec le promoteur de *ler* comparé à son affinité élevée avec le promoteur des gènes *nag*. À partir de ces observations, plusieurs hypothèses sont possibles afin d'expliquer la régulation de la transcription de *ler* par NagC. La première est que NagC agit indirectement en régulant l'expression d'un gène codant pour un régulateur de l'expression de *ler*. Cependant, nos analyses de la présence de boîtes NagC dans le génome d'EDL933

ne nous ont pas conduits à l'identification de gènes codant pour des régulateurs connus du LEE et dont l'expression serait contrôlée par NagC. La seconde hypothèse est que NagC serait un activateur direct de l'expression de *ler* qui agirait en coopération avec une autre protéine qui favoriserait son interaction avec le promoteur. Pour soutenir cette hypothèse, plusieurs protéines sont connues pour interagir avec NagC. Dans le cas de la répression de l'expression du gène *galP*, dont la région régulatrice ne contient qu'une seule boîte NagC, il a été suggéré que les protéines GalR et GalS favorisent l'interaction de NagC avec le promoteur [265]. Pour ce qui est de l'activation de la transcription de *fimB*, la protéine NagC se fixe sur deux opérateurs et agit en coopération avec le facteur IHF [268]. L'expression de *ler* étant régulée directement par de nombreuses protéines dont IHF, il est envisageable que l'interaction de NagC avec le promoteur de *ler* observée *in vitro* soit stabilisée *in vivo* à l'aide d'une autre protéine.

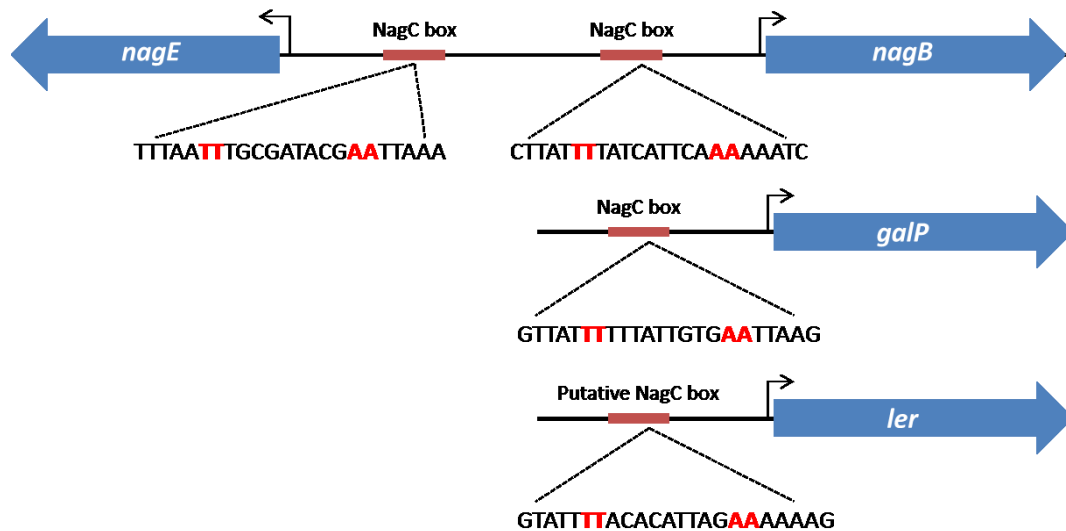


Figure 6. Représentation des séquences de fixation de NagC chez EDL933. Dans ce schéma sont représentées les boîtes NagC connues en amont des gènes *nagB*, *nagE* et *galP* ainsi que la boîte NagC potentielle en amont de *ler*. Les bases en rouge correspondent aux bases conservées dans les boîtes NagC.

Alors que de nombreux régulateurs transcriptionnels se fixent *in vitro* sur le promoteur de *ler*, seulement quelques motifs d'ADN de fixation ont été identifiés (Figure 7). La séquence d'ADN régulatrice de l'expression de *ler* comporte un promoteur proximal et un promoteur distal. Selon l'étude d'Islam *et al.* [269], le promoteur distal influencerait davantage l'expression de *ler* que le promoteur proximal. La séquence d'ADN de fixation de NagC identifiée par footprint se situe au niveau de la boîte -10 du promoteur distal (Figure 7). Pour le moment, nous ne connaissons pas la façon dont NagC active l'expression de *ler*. Cependant, il est intéressant de noter que le régulateur transcriptionnel GrlA nécessite 4 paires de bases, situées entre la boîte -10 et -35 du promoteur distal (Figure 7), afin d'activer l'expression de *ler* [269]. Ces 4 paires de bases sont situées à proximité ou bien chevauchent le site de fixation de NagC. Il est ainsi envisageable que NagC interagisse avec GrlA pour activer l'expression de *ler* en favorisant la fixation de l'ARN polymérase. Cette possibilité nécessite d'être étudié plus en détail.

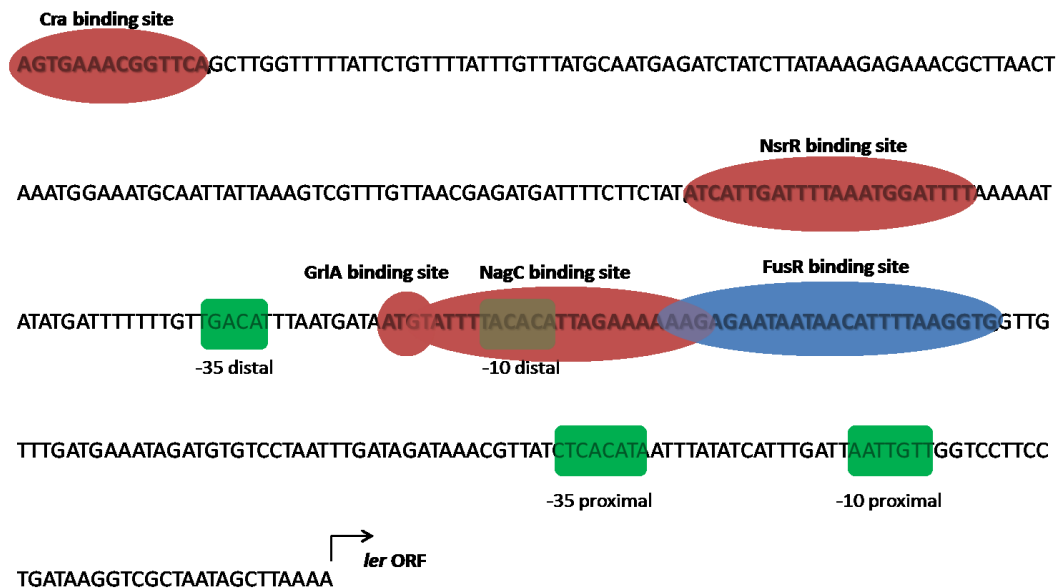


Figure 7. Représentation schématique du promoteur du LEE1 et des sites de fixation à l'ADN des régulateurs directs de l'expression de *ler*. Le promoteur de *ler* est constitué d'un promoteur proximal et d'un promoteur distal indiqués par

les boîtes -35 et -10 en vert. Les régions d'ADN nécessaires à la fixation d'une protéine activatrice sont représentées en rouge alors que celles permettant la fixation des répresseurs sont en bleue. Cra est un activateur transcriptionnel impliqué dans la détection des substrats de la néoglucogenèse [118]. NsrR active l'expression de *ler* et répond à la présence d'oxyde nitrique [127]. GrlA est un activateur transcriptionnel de *ler* et est codé par le LEE [269]. FusR est un répresseur transcriptionnel du système à deux composants FusKR impliqué dans la détection du fucose [117].

1.5. NagC, un activateur général de l'adhésion?

Plusieurs travaux identifient NagC comme un activateur de l'expression des adhésines. Alors que ce présent travail identifie NagC comme un activateur de la production du SST3 chez les EHEC, chez *E. coli* K12, NagC est un activateur de la production de fimbriae de type I et de curli [270,271]. Chez *E. coli*, le fimbriae de type I est codé par les gènes *fim* dont l'expression est contrôlée par un mécanisme de variation de phase grâce aux deux recombinases, FimE et FimB. Alors que FimE régule négativement la production de fimbriae (switch on-to-off), FimB est capable de l'activer ou l'inhiber (switch on-to-off ou bien off-to-on) [266]. Le régulateur NagC est un activateur de l'expression du gène *fimB*, favorisant ainsi la production de fimbriae de type I [271]. En présence de GlcNAc-6-P issu du transport du GlcNAc ou bien du catabolisme du Neu5Ac, NagC est délogé du promoteur de *fimB* ce qui inhibe la production de fimbriae de type I [271]. Dans ce mécanisme de régulation, NanR est également identifié comme activateur de l'expression de *fimB* [271]. Les fimbriae de type I sont des facteurs de virulence impliqués dans les infections urinaires en permettant l'invasion des cellules urothéliales [272]. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la production de fimbriae de type I serait une stratégie utilisée par *E. coli* pour éviter la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Toujours chez *E. coli* K12, une délétion du gène *nagC* conduit à une diminution de la production de curli [270]. Les auteurs démontrent que l'expression des gènes *csgAB* et *csgDEFG* est diminuée dans le mutant Δ *nagC* par rapport à la souche

sauvage mais le mécanisme impliqué dans cette régulation demeure méconnu [270]. Les curli sont impliqués dans différents processus physiologiques et pathogènes, tels que l'adhésion aux surfaces inertes et biologiques, la formation de biofilm, l'invasion cellulaire et l'activation du système immunitaire [273]. Ces deux études ainsi que nos travaux démontrent l'implication de NagC comme activateur de la production des adhésines chez *E. coli* K12 et pathogènes et mettent en évidence le rôle de l'utilisation du Neu5Ac et du GlcNAc comme source de carbone dans la suppression de cette activation.

Étant donné le rôle suspecté de NagC dans l'activation de différentes adhésines chez *E. coli*, nous avons entrepris de tester l'effet de la délétion de *nagC* ainsi que l'effet du catabolisme du GlcNAc et du Neu5Ac sur la formation de biofilm de notre souche EHEC EDL933. Des résultats préliminaires suggèrent qu'une délétion du gène *nagC* inhibe la formation de biofilm chez EDL933. De même, nous avons observé que la supplémentation en Neu5Ac et en GlcNAc du milieu d'incubation d'EDL933 pourrait résulter en une inhibition de la formation de biofilm. La formation de biofilm chez le mutant $\Delta nagC$ est inférieure à celle du mutant $\Delta escN$ ce qui indique que la production de facteurs d'adhésion autre que le SST3 seraient réprimés chez EDL933. Les EHEC O157:H7 ne produisant pas de fimbriae de type I [274], une étude plus approfondie est menée actuellement afin d'identifier les adhésines potentiellement réprimées chez le mutant $\Delta nagC$ de notre souche EDL933.

1.6. Pourquoi réprimer l'expression des gènes de SST3?

Alors que NagC est un activateur des gènes codant pour le SST3, l'incubation de EDL933 dans le milieu DMEM supplémenté avec du Neu5Ac ou bien du GlcNAc résulte en une inhibition NagC-dépendante de l'expression des gènes du LEE. Or l'expression du LEE et la production des effecteurs sécrétés par le SST3 telle l'intimine contribuent à la colonisation intestinale et sont associés la

virulence des pathogènes formants des lésions A/E [275-277]. Par conséquent, la question se pose à savoir pourquoi les EHEC ont évolué afin de pouvoir réprimer l'expression des gènes du SST3 en réponse à la présence de certains nutriments retrouvés dans l'intestin mammifère. Pour cela, nous émettons deux hypothèses.

La première hypothèse serait que les sucres dérivés de la mucine, en plus d'être utilisés comme source de carbone, permettent aux EHEC de se repérer dans la niche intestinale et servent à la régulation spatiotemporelle des gènes du SST3. Les intestins comportent différentes niches distinctes. Si on se réfère au colon qui est la niche préférentielle des EHEC, on distingue la lumière intestinale, la couche de mucus et finalement l'épithélium intestinal. La couche de mucus est elle-même subdivisée en une couche lâche en contact avec le microbiote intestinal et digérée par les différentes glycosidases et une couche dense considérée comme impénétrable par les bactéries [263]. L'action des glycosidases du microbiote intestinal conduit très probablement à l'apparition d'un gradient de concentration en sucres dérivés de la mucine, lequel serait décroissant en partant de la lumière intestinale vers l'épithélium (Figure 7). Alors qu'à proximité de la couche lâche de mucus la libération du GlcNAc et du Neu5Ac de la mucine par le microbiote conduirait à la répression des gènes du LEE, à proximité de l'épithélium, l'activation des gènes du LEE par NagC serait rendue possible à cause de l'absence d'activité glycosidase du microbiote et de l'absence des composés solubles. Ceci contribuerait à l'activation de la production du SST3 et à l'attachement des EHEC à l'épithélium. Une hypothèse similaire a été proposée récemment dans le cas de la régulation des gènes du LEE par le fucose [117]. Le fucose est un sucre associé à la mucine qui est libéré sous l'action des fucosidases de *B. thetaiotaomicron* et qui conduit à la répression de *ler* via le système à deux composants FusKR [117]. La régulation spatiotemporelle des gènes de virulence est un processus répandu chez les pathogènes intestinaux [278]. L'exemple de *Shigella* énoncé plus haut illustre bien ce processus. Chez *Shigella* l'expression des gènes impliqués dans la sécrétion de type III est contrôlée par le gradient de concentration en oxygène dans l'intestin. Alors que Fnr réprime les gènes

impliqués dans la sécrétion de type III en anaérobiose, la répression est levée à proximité de la muqueuse intestinale où *Shigella* rencontre l'oxygène diffusant à partir des capillaires sanguins [257].

La deuxième hypothèse est celle de la régulation des gènes du SST3 dans le cadre de la compétition nutritionnelle avec le microbiote intestinal. En absence de compétiteurs, les EHEC rencontreraient suffisamment de sucres dérivés de la mucine dont le Neu5Ac et le GlcNAc et favoriseraient le catabolisme au détriment de la production du SST3. Au contraire, en présence de compétiteurs, tels que les *E. coli* commensales qui sont capables d'utiliser de plus efficacement les sources de carbone [8], les EHEC auraient un accès limité en Neu5Ac et en GlcNAc ce qui conduirait à la production NagC dépendante du SST3 et à l'attachement du pathogène à l'épithélium intestinal. Ce genre de stratégie a été mis en évidence par Kamada *et al.* [230] qui utilisent le pathogène de souris *C. rodentium* qui reflète les infections à EHEC. Les auteurs démontrent que l'expression du SST3 et l'attachement à l'épithélium intestinal sont requis pour la persistance intestinale de *C. rodentium* chez les souris associées au microbiote intestinal mais pas chez les souris axéniques [230]. La relocalisation des pathogènes attachants et effaçants au niveau de l'épithélium serait une stratégie utilisée pour éviter la compétition avec le microbiote intestinal et persister plus longtemps dans l'intestin (Figure 7).

L'acquisition des mécanismes de répression des gènes de virulence par les pathogènes intestinaux est un processus répandu et dont la pertinence commence à être comprise [117,257]. La compréhension des mécanismes de régulation des gènes de virulence peut mener à l'élaboration de stratégies visant à limiter les infections à EHEC.

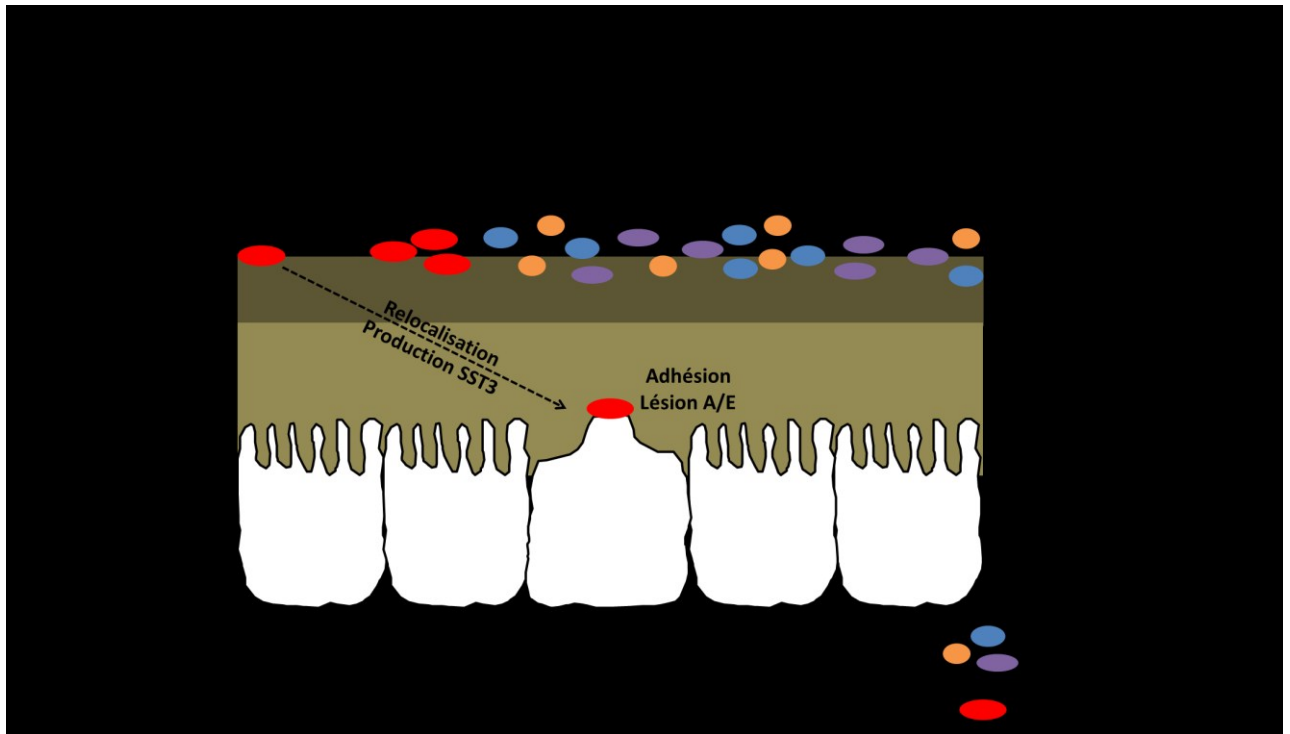


Figure 8. Modèle de relocalisation intestinal des EHEC O157:H7 en fonction de la concentration en Neu5Ac et GlcNAc. Selon ce modèle, le microbiote intestinal induirait un gradient de concentration de Neu5Ac et GlcNAc au niveau de la mucine intestinale. En condition d'abondance en Neu5Ac et GlcNAc, les EHEC O157:H7 catabolisent les sucres dérivés de la mucine. Le catabolisme du Neu5Ac et du GlcNAc inhibe l'expression des gènes du LEE. En carence en Neu5Ac et en GlcNAc, le régulateur NagC est fonctionnel et active la production du SST3 ce qui mène à la formation de lésions A/E.

2. Conclusion

Durant ce projet de doctorat, nous avons montré que l'adaptation métabolique de notre souche EHEC O157:H7 EDL933 à l'activité du microbiote intestinal humain passe par une transition d'un profil glycolytique à un profil anaplérotique. Alors qu'EDL933 rencontre des conditions en carence en nutriments dans le milieu intestinal conditionné par le microbiote, nous avons identifié plusieurs voies de catabolisme de substrats néoglucogéniques qui sont activées en réponse à l'activité métabolique du microbiote et qui pourraient jouer un rôle important dans la colonisation ou la persistance intestinale des EHEC. Concrètement, nous avons mis en évidence une forte activation de *tnaA* codant pour la tryptophanase et une consommation du tryptophane en réponse au microbiote intestinal. Nous avons également identifié les voies de catabolisme du Neu5Ac, des composés aromatiques et du propionate ainsi que les voies de transport du lactate, de la phénylalanine et de la leucine comme contribuant à l'adaptation d'EDL933 à l'activité du microbiote intestinal.

Ce travail a permis la mise en évidence de la capacité du microbiote intestinal à inhiber l'expression des gènes de virulence impliqués dans les lésions A/E chez les EHEC. De plus, alors que le microbiote intestinal réprime modestement l'expression des gènes du LEE chez EDL933, nous avons montré que l'activité métabolique de *B. thetaiotaomicron* induit un effet inhibiteur plus important que celle du microbiote.

Nous avons identifié le Neu5Ac et le GlcNAc comme des composés inhibiteurs de l'expression des gènes du LEE dans un milieu défini, et montré que ces composés sont relâchés dans le contenu intestinal par *B. thetaiotaomicron*. Nous avons montré que la répression des gènes du LEE par le Neu5Ac et le GlcNAc est NagC-dépendante. NagC est un inhibiteur de la transcription des gènes requis pour le catabolisme du GlcNAc et du galactose. Ce rôle de NagC a

été confirmé chez les EHEC et nous avons mis en évidence son rôle d'activateur transcriptionnel des gènes du LEE. Ainsi, nous avons identifié un nouveau mécanisme de coordination de la virulence avec le métabolisme chez les EHEC qui dépend de la présence du Neu5Ac et du GlcNAc.

La compréhension des mécanismes de coordination de la virulence avec le métabolisme ouvre la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies visant à limiter les infections à EHEC. L'utilisation de prébiotiques ou bien de probiotiques, visant à stimuler la libération de composés intestinaux réprimant la virulence des EHEC, est une approche prometteuse pour prévenir les infections humaines ou bien limiter le portage bovin.

Section V- Bibliographie

1. van Tongeren SP, Slaets JP, Harmsen HJ, Welling GW (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71: 6438-6442.
2. Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM, Mercado-Lubo R, Conway T, et al. (2009) Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun* 77: 2876-2886.
3. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T (2013) Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8: e53957.
4. Bentley R, Meganathan R (1982) Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev* 46: 241-280.
5. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, et al. (2013) Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 15: 610-622.
6. Bertin Y, Deval C, de la Foye A, Masson L, Gannon V, et al. (2014) The gluconeogenesis pathway is involved in maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *PLoS One* 9: e98367.
7. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, et al. (2008) Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 76: 1143-1152.
8. Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, et al. (2004) Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun* 72: 1666-1676.
9. Foster JW (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2: 898-907.

10. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, et al. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26: 822-880.
11. Levine MM (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 155: 377-389.
12. Mora A, Herrera A, Lopez C, Dahbi G, Mamani R, et al. (2011) Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. Int Microbiol 14: 121-141.
13. Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL (2006) The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Clin Infect Dis 43: 1587-1595.
14. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, et al. (2005) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis 192: 1422-1429.
15. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, et al. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 41: 4930-4940.
16. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, et al. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 308: 681-685.
17. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, et al. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J Clin Microbiol 18: 512-520.
18. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, et al. (2013) Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. Foodborne Pathog Dis 10: 639-648.

19. Zhou Z, Li X, Liu B, Beutin L, Xu J, et al. (2010) Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. PLoS One 5: e8700.
20. Feng PC, Monday SR, Lacher DW, Allison L, Siitonen A, et al. (2007) Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model. Emerg Infect Dis 13: 1701-1706.
21. Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, et al. (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect Immun 61: 1619-1629.
22. Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, et al. (2003) Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Infect Immun 71: 1505-1512.
23. Keen JE, Laegreid WW, Chitko-McKown CG, Durso LM, Bono JL (2010) Distribution of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. Appl Environ Microbiol 76: 5278-5281.
24. Ferens WA, Hovde CJ (2011) *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. Foodborne Pathog Dis 8: 465-487.
25. Hussein HS, Bollinger LM (2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. J Food Prot 68: 2224-2241.
26. Jenkins C, Pearce MC, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, et al. (2002) An eight-month study of a population of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Scottish cattle herd. J Appl Microbiol 93: 944-953.
27. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L (1995) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. Appl Environ Microbiol 61: 1290-1293.
28. Cobbold RN, Hancock DD, Rice DH, Berg J, Stilborn R, et al. (2007) Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics. Appl Environ Microbiol 73: 1563-1568.

29. Cray WC, Jr., Moon HW (1995) Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586-1590.
30. Garber LP, Wells SJ, Hancock DD, Doyle MP, Tuttle J, et al. (1995) Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 207: 46-49.
31. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, et al. (1991) Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* 29: 985-989.
32. Shere JA, Bartlett KJ, Kaspar CW (1998) Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 64: 1390-1399.
33. Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP (1997) Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol* 63: 27-32.
34. Harmon BG, Brown CA, Tkalcic S, Mueller PO, Parks A, et al. (1999) Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J Food Prot* 62: 574-579.
35. Strachan NJ, Doyle MP, Kasuga F, Rotariu O, Ogden ID (2005) Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int J Food Microbiol* 103: 35-47.
36. Teunis P, Takumi K, Shinagawa K (2004) Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data. *Risk Anal* 24: 401-407.
37. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, et al. (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272: 1349-1353.
38. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365: 1073-1086.

39. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, et al. (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 188: 719-729.
40. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603-609.
41. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, et al. (2012) Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis* 55: 33-41.
42. Spinale JM, Ruebner RL, Copelovitch L, Kaplan BS (2013) Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 28: 2097-2105.
43. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, et al. (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365: 1771-1780.
44. Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, et al. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 150: 787-796.
45. Salvadori MI, Sontrop JM, Garg AX, Moist LM, Suri RS, et al. (2009) Factors that led to the Walkerton tragedy. *Kidney Int Suppl*: S33-34.
46. Goldwater PN, Bettelheim KA (2012) Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med* 10: 12.
47. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342: 1930-1936.

48. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, et al. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* 181: 664-670.
49. Grif K, Dierich MP, Karch H, Allerberger F (1998) Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 761-766.
50. Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, Boppel T, Kirschfink M, et al. (2011) Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med* 364: 2561-2563.
51. Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, et al. (2001) Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 184: 738-742.
52. Sheoran AS, Chapman-Bonofiglio S, Harvey BR, Mukherjee J, Georgiou G, et al. (2005) Human antibody against shiga toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. *Infect Immun* 73: 4607-4613.
53. Trachtman H, Cnaan A, Christen E, Gibbs K, Zhao S, et al. (2003) Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 1337-1344.
54. Paton AW, Morona R, Paton JC (2000) A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med* 6: 265-270.
55. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
56. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB (2007) Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20: 535-549.

57. Carvalho HM, Teel LD, Goping G, O'Brien AD (2005) A three-dimensional tissue culture model for the study of attach and efface lesion formation by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 7: 1771-1781.
58. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73: 2573-2585.
59. Kresse AU, Schulze K, Deibel C, Ebel F, Rohde M, et al. (1998) Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 4370-4379.
60. Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71: 3310-3319.
61. O'Connell CB, Creasey EA, Knutton S, Elliott S, Crowther LJ, et al. (2004) SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol* 52: 1613-1625.
62. Ogino T, Ohno R, Sekiya K, Kuwae A, Matsuzawa T, et al. (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 2801-2811.
63. Crepin VF, Prasannan S, Shaw RK, Wilson RK, Creasey E, et al. (2005) Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol Microbiol* 55: 1658-1670.
64. Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, Vuckovic M, Thomas NA, et al. (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 435: 702-707.
65. Wilson RK, Shaw RK, Daniell S, Knutton S, Frankel G (2001) Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 753-762.

66. Daniell SJ, Kocsis E, Morris E, Knutton S, Booy FP, et al. (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49: 301-308.
67. Daniell SJ, Takahashi N, Wilson R, Friedberg D, Rosenshine I, et al. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 865-871.
68. Delahay RM, Knutton S, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, et al. (1999) The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 35969-35974.
69. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, et al. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11638-11643.
70. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, et al. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17: 2166-2176.
71. Kenny B, Ellis S, Leard AD, Warawa J, Mellor H, et al. (2002) Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* 44: 1095-1107.
72. Tu X, Nisan I, Yona C, Hanski E, Rosenshine I (2003) EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 47: 595-606.
73. Wong AR, Raymond B, Collins JW, Crepin VF, Frankel G (2012) The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). *Cell Microbiol* 14: 1051-1070.

74. Viswanathan VK, Lukic S, Koutsouris A, Miao R, Muza MM, et al. (2004) Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection. *Cell Microbiol* 6: 987-997.
75. Matsuzawa T, Kuwae A, Yoshida S, Sasakawa C, Abe A (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *EMBO J* 23: 3570-3582.
76. Shaw RK, Smollett K, Cleary J, Garmendia J, Straatman-Iwanowska A, et al. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 73: 4385-4390.
77. McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Sonnenberg MS, et al. (2001) Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* 107: 621-629.
78. Dean P, Kenny B (2004) Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol Microbiol* 54: 665-675.
79. Nagai T, Abe A, Sasakawa C (2005) Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J Biol Chem* 280: 2998-3011.
80. Crane JK, McNamara BP, Sonnenberg MS (2001) Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 197-211.
81. Nougayrede JP, Sonnenberg MS (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* 6: 1097-1111.

82. Yen H, Ooka T, Iguchi A, Hayashi T, Sugimoto N, et al. (2010) NleC, a type III secretion protease, compromises NF-kappaB activation by targeting p65/RelA. PLoS Pathog 6: e1001231.
83. Gao X, Wan F, Mateo K, Callegari E, Wang D, et al. (2009) Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. PLoS Pathog 5: e1000708.
84. Wan F, Weaver A, Gao X, Bern M, Hardwidge PR, et al. (2011) IKKbeta phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF-kappaB function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. Nat Immunol 12: 335-343.
85. Gao X, Wang X, Pham TH, Feuerbacher LA, Lubos ML, et al. (2013) NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF-kappaB activation. Cell Host Microbe 13: 87-99.
86. Marches O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, et al. (2008) EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. Cell Microbiol 10: 1104-1115.
87. Kim J, Thanabalasuriar A, Chaworth-Musters T, Fromme JC, Frey EA, et al. (2007) The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. Cell Host Microbe 2: 160-171.
88. Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, et al. (2006) An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 14941-14946.
89. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 1664-1668.
90. Sperandio V, Li CYC, Kaper JB (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: A regulator of the LysR family involved in the regulation of

- the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E-coli*. *Infect Immun* 70: 3085-3093.
91. Sharp FC, Sperandio V (2007) QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75: 2432-2440.
 92. Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, et al. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236-238.
 93. Umanski T, Rosenshine I, Friedberg D (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 148: 2735-2744.
 94. Levine JA, Hansen AM, Michalski JM, Hazen TH, Rasko DA, et al. (2014) H-NST induces LEE expression and the formation of attaching and effacing lesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9: e86618.
 95. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, et al. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68: 6115-6126.
 96. Hacker J, Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-679.
 97. Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33: 296-306.
 98. Sperandio V, Mellies JL, Delahay RM, Frankel G, Crawford JA, et al. (2000) Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* 38: 781-793.
 99. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM (2007) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* 75: 4199-4210.

100. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39: 664-678.
101. Torres AG, Lopez-Sanchez GN, Milflores-Flores L, Patel SD, Rojas-Lopez M, et al. (2007) Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 189: 5916-5928.
102. Lathem WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, et al. (2002) StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 45: 277-288.
103. Berdichevsky T, Friedberg D, Nadler C, Rokney A, Oppenheim A, et al. (2005) Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 349-357.
104. Mellies JL, Benison G, McNitt W, Mavor D, Boniface C, et al. (2011) Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein-DNA complexes. *Microbiology* 157: 1123-1133.
105. Mellies JL, Larabee FJ, Zarr MA, Horback KL, Lorenzen E, et al. (2008) Ler interdomain linker is essential for anti-silencing activity in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 154: 3624-3638.
106. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, et al. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3597-3602.
107. Padavannil A, Jobichen C, Mills E, Velazquez-Campoy A, Li M, et al. (2013) Structure of GrlR-GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes. *Nat Commun* 4: 2546.
108. Iyoda S, Watanabe H (2005) ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 4086-4094.

109. Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, et al. (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62: 3094-3100.
110. Tatsuno I, Nagano K, Taguchi K, Rong L, Mori H, et al. (2003) Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 71: 2598-2606.
111. Tree JJ, Roe AJ, Flockhart A, McAteer SP, Xu X, et al. (2011) Transcriptional regulators of the GAD acid stress island are carried by effector protein-encoding prophages and indirectly control type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 80: 1349-1365.
112. Sperandio V (2010) SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 in the bovine rumen. *Gut Microbes* 1: 432-435.
113. Hughes DT, Terekhova DA, Liou L, Hovde CJ, Sahl JW, et al. (2010) Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9831-9836.
114. Garsin DA (2010) Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nat Rev Microbiol* 8: 290-295.
115. Luzader DH, Clark DE, Gonyar LA, Kendall MM (2013) EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 195: 4947-4953.
116. Bertin Y, Girardeau JP, Chaucheyras-Durand F, Lyan B, Pujos-Guillot E, et al. (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 13: 365-377.
117. Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, et al. (2012) Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492: 113-117.

118. Njoroge JW, Nguyen Y, Curtis MM, Moreira CG, Sperandio V (2012) Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. MBio 3: e00280-00212.
119. Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR (2013) The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. PLoS Pathog 9: e1003201.
120. Hughes DT, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol 6: 111-120.
121. Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V (2009) The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). PLoS Pathog 5: e1000553.
122. Reading NC, Torres AG, Kendall MM, Hughes DT, Yamamoto K, et al. (2007) A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. J Bacteriol 189: 2468-2476.
123. Reading NC, Rasko DA, Torres AG, Sperandio V (2009) The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 5889-5894.
124. Njoroge J, Sperandio V (2012) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. Infect Immun 80: 688-703.
125. Vallance BA, Deng W, De Grado M, Chan C, Jacobson K, et al. (2002) Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. Infect Immun 70: 6424-6435.
126. Brunelli L, Crow JP, Beckman JS (1995) The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 316: 327-334.

127. Branchu P, Matrat S, Vareille M, Garrivier A, Durand A, et al. (2014) NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog* 10: e1003874.
128. Habdas BJ, Smart J, Kaper JB, Sperandio V (2010) The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192: 3699-3712.
129. Iyoda S, Watanabe H (2004) Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEP-2 cells. *Microbiology* 150: 2357-2571.
130. Porter ME, Mitchell P, Free A, Smith DG, Gally DL (2005) The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J Bacteriol* 187: 458-472.
131. Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H (2009) LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol Microbiol* 74: 1393-1341.
132. Li M, Rosenshine I, Tung SL, Wang XH, Friedberg D, et al. (2004) Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. *Appl Environ Microbiol* 70: 5274-5282.
133. Friedberg D, Umanski T, Fang Y, Rosenshine I (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34: 941-952.
134. Friedman DI (1988) Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* 55: 545-554.

135. Goosen N, van de Putte P (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* 16: 1-7.
136. Sharma VK, Zuerner RL (2004) Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 186: 7290-7301.
137. Nieto JM, Madrid C, Prenafeta A, Miquelay E, Balsalobre C, et al. (2000) Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol Gen Genet* 263: 349-358.
138. Zhang L, Chaudhuri RR, Constantinidou C, Hobman JL, Patel MD, et al. (2004) Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* 72: 7282-7293.
139. Flockhart AF, Tree JJ, Xu X, Karpiyevich M, McAteer SP, et al. (2012) Identification of a novel prophage regulator in *Escherichia coli* controlling the expression of type III secretion. *Mol Microbiol* 83: 208-223.
140. Xu X, McAteer SP, Tree JJ, Shaw DJ, Wolfson EB, et al. (2012) Lysogeny with Shiga toxin 2-encoding bacteriophages represses type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 8: e1002672.
141. Hansen AM, Kaper JB (2009) Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 73: 446-465.
142. Shakhnovich EA, Davis BM, Waldor MK (2009) Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol Microbiol* 74: 347-363.
143. Kendall MM, Gruber CC, Rasko DA, Hughes DT, Sperandio V (2011) Hfq virulence regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24. *J Bacteriol* 193: 6843-6851.

144. Laaberki MH, Janabi N, Oswald E, Repoila F (2006) Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* 296: 197-210.
145. Gruber CC, Sperandio V (2014) Posttranscriptional control of microbe-induced rearrangement of host cell actin. *MBio* 5: e01025-01013.
146. Reichenbach B, Maes A, Kalamorz F, Hajnsdorf E, Gorke B (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 36: 2570-2580.
147. Mills E, Baruch K, Aviv G, Nitzan M, Rosenshine I (2013) Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *MBio* 4.
148. Mills E, Baruch K, Charpentier X, Kobi S, Rosenshine I (2008) Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host Microbe* 3: 104-113.
149. Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL (2009) Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 17: 361-370.
150. Elliott SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, Mellies JL, Wainwright LA, et al. (1999) Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33: 1176-1189.
151. Cain RJ, Hayward RD, Koronakis V (2008) Deciphering interplay between *Salmonella* invasion effectors. *PLoS Pathog* 4: e1000037.
152. Farfan MJ, Cantero L, Vidal R, Botkin DJ, Torres AG (2011) Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 79: 3744-3750.
153. Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldana Z, Jordan D, Tarr PI, et al. (2009) The *Escherichia coli ycbQRST* operon encodes fimbriae with

- laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. *Environ Microbiol* 11: 1815-1826.
154. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, et al. (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70: 5416-5427.
 155. Torres AG, Kanack KJ, Tutt CB, Popov V, Kaper JB (2004) Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 238: 333-344.
 156. Chingcuanco F, Yu Y, Kus JV, Que L, Lackraj T, et al. (2012) Identification of a novel adhesin involved in acid-induced adhesion of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* 158: 2399-2407.
 157. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldana Z, Ledesma MA, Puente JL, et al. (2009) The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol* 191: 411-421.
 158. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, et al. (2007) Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest* 117: 3519-3529.
 159. Stevens MP, Roe AJ, Vlisidou I, van Diemen PM, La Ragione RM, et al. (2004) Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun* 72: 5402-5411.
 160. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, et al. (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69: 6660-6669.

161. Torres AG, Perna NT, Burland V, Ruknudin A, Blattner FR, et al. (2002) Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45: 951-966.
162. Wells TJ, McNeilly TN, Totsika M, Mahajan A, Gally DL, et al. (2009) The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environ Microbiol* 11: 1803-1814.
163. Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, et al. (2008) EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* 10: 589-604.
164. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, et al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50: 2951-2963.
165. Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK, O'Brien AD (1988) Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* 170: 1116-1122.
166. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146: 763-769.
167. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, et al. (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 497-503.
168. Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, et al. (2006) New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 32: 105-112.
169. Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ, Solow BT (2004) Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces

- recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *Appl Environ Microbiol* 70: 7173-7178.
170. Betz J, Bauwens A, Kunsmann L, Bielaszewska M, Mormann M, et al. (2012) Uncommon membrane distribution of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in toxin-sensitive human glomerular microvascular endothelial cells. *Biol Chem* 393: 133-147.
 171. Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, et al. (2011) Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J Lipid Res* 52: 618-634.
 172. Sandvig K, van Deurs B (1994) Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Lett* 346: 99-102.
 173. Law D (2000) Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 88: 729-745.
 174. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD (2006) Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9667-9672.
 175. Paton JC, Paton AW (2006) Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. *Kidney International* 70: 2049-2051.
 176. Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B (1983) Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* 2: 216.
 177. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, et al. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226: 694-696.
 178. Sutton MD, Smith BT, Godoy VG, Walker GC (2000) The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* 34: 479-497.
 179. Janion C (2001) Some aspects of the SOS response system - A critical survey. *Acta Biochimica Polonica* 48: 599-610.

180. Waldor MK, Friedman DI (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 8: 459-465.
181. Sung LM, Jackson MP, O'Brien AD, Holmes RK (1990) Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6386-6395.
182. Wagner PL, Acheson DWK, Waldor MK (2001) Human neutrophils and their products induce shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69: 1934-1937.
183. Vareille M, de Sablet T, Hindre T, Martin C, Gobert AP (2007) Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10199-10204.
184. de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, et al. (2009) Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 77: 783-790.
185. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, et al. (2003) Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71: 3634-3638.
186. Elwell CA, Dreyfus LA (2000) DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol* 37: 952-963.
187. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, et al. (2004) Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun* 72: 1812-1816.
188. Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, et al. (2007) Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect* 9: 282-290.
189. Brockmeyer J, Aldick T, Soltwisch J, Zhang W, Tarr PI, et al. (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin is cleaved and

- inactivated by serine protease EspP alpha. *Environ Microbiol* 13: 1327-1341.
190. Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, et al. (2007) Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol* 73: 6351-6359.
 191. Brunder W, Schmidt H, Karch H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24: 767-778.
 192. Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, Khan AB, Huber G, et al. (2010) EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect Immun* 78: 4294-4301.
 193. Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA (2005) The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 73: 1295-1303.
 194. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
 195. Szabady RL, Lokuta MA, Walters KB, Huttenlocher A, Welch RA (2009) Modulation of neutrophil function by a secreted mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS Pathog* 5: e1000320.
 196. Keen JE, Elder RO (2002) Isolation of shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 from hide surfaces and the oral cavity of finished beef feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 220: 756-763.
 197. Wolin MJ (1969) Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. *Appl Microbiol* 17: 83-87.
 198. Laven RA, Ashmore A, Stewart CS (2003) *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157. *Vet J* 165: 78-83.

199. Callaway TR, Carr MA, Edrington TS, Anderson RC, Nisbet DJ (2009) Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* 11: 67-79.
200. Buchko SJ, Holley RA, Olson WO, Gannon VP, Veira DM (2000) The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *J Food Prot* 63: 1467-1474.
201. Chaucheyras-Durand F, Faqir F, Ameilbonne A, Rozand C, Martin C (2010) Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl Environ Microbiol* 76: 640-647.
202. Stevens MP, van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS (2002) Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology* 148: 3767-3778.
203. Grauke LJ, Kudva IT, Yoon JW, Hunt CW, Williams CJ, et al. (2002) Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 68: 2269-2277.
204. Naylor SW, Roe AJ, Nart P, Spears K, Smith DGE, et al. (2005) *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology* 151: 2773-2781.
205. Girard F, Dziva F, van Diemen P, Phillips AD, Stevens MP, et al. (2007) Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O26, and O111 strains to bovine intestinal explants ex vivo. *Appl Environ Microbiol* 73: 3084-3090.
206. Myhal ML, Laux DC, Cohen PS (1982) Relative colonizing abilities of human fecal and K 12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Eur J Clin Microbiol* 1: 186-192.
207. Wadolkowski EA, Burriss JA, O'Brien AD (1990) Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 58: 2438-2445.

208. Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC (2004) Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem J* 384: 307-316.
209. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, et al. (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502: 96-99.
210. Kendall MM, Gruber CC, Parker CT, Sperandio V (2012) Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio* 3.
211. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, et al. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.
212. Xu J, Gordon JI (2003) Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10452-10459.
213. O'Hara AM, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7: 688-693.
214. Sartor RB (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-594.
215. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-1638.
216. Ze XL, Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2012) *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *Isme Journal* 6: 1535-1543.
217. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, et al. (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299: 2074-2076.
218. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC (2012) How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 10: 323-335.

219. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA (2006) Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40: 235-243.
220. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15451-15455.
221. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL (2007) Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19: 70-83.
222. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126-1130.
223. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20858-20863.
224. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, Thanachayanont T, Finlay BB (2011) Altering Host Resistance to Infections through Microbial Transplantation. *Plos One* 6.
225. Brandt LJ, Reddy SS (2011) Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Clin Gastroenterol* 45 Suppl: S159-167.
226. Buffie CG, Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13: 790-801.
227. Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11: 95-105.
228. Freter R, Brickner H, Botney M, Cleven D, Aranki A (1983) Mechanisms That Control Bacterial-Populations in Continuous-Flow Culture Models of Mouse Large Intestinal Flora. *Infect Immun* 39: 676-685.
229. Momose Y, Hirayama K, Itoh K (2008) Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E-coli* O157 : H7 in gnotobiotic mice

- associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E-coli* O157 : H7. *Ant Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 94: 165-171.
230. Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, et al. (2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 336: 1325-1329.
231. Cummings JH, Macfarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443-459.
232. Takao M, Yen H, Tobe T (2014) LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 93: 1302-1313.
233. Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, et al. (2009) Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 155: 521-530.
234. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8951-8956.
235. Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10420-10425.
236. Bommarius B, Anyanful A, Izrayelit Y, Bhatt S, Cartwright E, et al. (2013) A family of indoles regulate virulence and Shiga toxin production in pathogenic *E. coli*. *PLoS One* 8: e54456.
237. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, et al. (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* 75: 4597-4607.
238. Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1996) A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273: 1380-1383.

239. Britton RA, Young VB (2012) Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. Trends Microbiol 20: 313-319.
240. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, et al. (2008) Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. Infect Immun 76: 4726-4736.
241. Wlodarska M, Willing B, Keeney KM, Menendez A, Bergstrom KS, et al. (2011) Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. Infect Immun 79: 1536-1545.
242. Hoffmann C, Hill DA, Minkah N, Kirn T, Troy A, et al. (2009) Community-wide response of the gut microbiota to enteropathogenic *Citrobacter rodentium* infection revealed by deep sequencing. Infect Immun 77: 4668-4678.
243. Alpert C, Sczesny S, Gruhl B, Blaut M (2008) Long-term stability of the human gut microbiota in two different rat strains. Curr Issues Mol Biol 10: 17-24.
244. Crouzet L, Gaultier E, Del'Homme C, Cartier C, Delmas E, et al. (2013) The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. Neurogastroenterol Motil 25: e272-282.
245. Dostal A, Lacroix C, Pham VT, Zimmermann MB, Del'homme C, et al. (2014) Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats. Br J Nutr 111: 2135-2145.
246. Hirayama K, Itoh K, Takahashi E, Mitsuoka T (1995) Comparison of Composition of Fecal Microbiota and Metabolism of Fecal Bacteria among Human-Flora-Associated Mice Inoculated with Feces from 6 Different Human Donors. Microb Ecol Health Dis 8: 199-211.

247. Hirayama K (1999) Ex-germfree mice harboring intestinal microbiota derived from other animal species as an experimental model for ecology and metabolism of intestinal bacteria. *Exp Anim* 48: 219-227.
248. O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB (1983) *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1: 702.
249. Roland K, Curtiss R, 3rd, Sizemore D (1999) Construction and evaluation of a delta cya delta crp *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis* 43: 429-441.
250. Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69: 301-315.
251. Simons RW, Houman F, Kleckner N (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53: 85-96.
252. Kornberg HL (1965) Anaplerotic Sequences in Microbial Metabolism. *Angewandte Chemie-International Edition* 4: 558-&.
253. Alteri CJ, Smith SN, Mobley HL (2009) Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog* 5: e1000448.
254. Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, et al. (2004) Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7427-7432.
255. Mercado-Lubo R, Gauger EJ, Leatham MP, Conway T, Cohen PS (2008) A *Salmonella enterica* serovar typhimurium succinate dehydrogenase/fumarate reductase double mutant is avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infect Immun* 76: 1128-1134.
256. Fink RC, Evans MR, Porwollik S, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, et al. (2007) FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in

- Salmonella enterica* serovar typhimurium (ATCC 14028s). J Bacteriol 189: 2262-2273.
257. Marteyn B, West NP, Browning DF, Cole JA, Shaw JG, et al. (2010) Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. Nature 465: 355-358.
258. Schuller S, Phillips AD (2010) Microaerobic conditions enhance type III secretion and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to polarized human intestinal epithelial cells. Environ Microbiol 12: 2426-2435.
259. Severi E, Hood DW, Thomas GH (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. Microbiology 153: 2817-2822.
260. Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF (2014) Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. MBio 5: e00909-00914.
261. Human Microbiome Project C (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486: 207-214.
262. Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM, et al. (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. Gut Microbes 1: 254-268.
263. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 108 Suppl 1: 4659-4665.
264. Plumbridge JA (1991) Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. Mol Microbiol 5: 2053-2062.
265. El Qaidi S, Allemand F, Oberto J, Plumbridge J (2009) Repression of *galP*, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. Mol Microbiol 71: 146-157.

266. McClain MS, Blomfield IC, Eisenstein BI (1991) Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 5308-5314.
267. El Qaidi S, Plumbridge J (2008) Switching control of expression of *ptsG* from the Mlc regulon to the NagC regulon. *J Bacteriol* 190: 4677-4686.
268. Sohanpal BK, Friar S, Roobol J, Plumbridge JA, Blomfield IC (2007) Multiple co-regulatory elements and IHF are necessary for the control of *fimB* expression in response to sialic acid and N-acetylglucosamine in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 63: 1223-1236.
269. Islam MS, Bingle LE, Pallen MJ, Busby SJ (2011) Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Mol Microbiol* 79: 468-483.
270. Barnhart MM, Lynem J, Chapman MR (2006) GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 5212-5219.
271. Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA, Blomfield IC (2004) Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16322-16327.
272. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA, et al. (2012) Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev* 36: 616-648.
273. Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60: 131-147.
274. Roe AJ, Currie C, Smith DG, Gally DL (2001) Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiology* 147: 145-152.

275. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'Brien AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect Immun* 66: 4560-4563.
276. Deng WY, Vallance BA, Li YL, Puente JL, Finlay BB (2003) *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* 48: 95-115.
277. Schauer DB, Falkow S (1993) The Eae Gene of *Citrobacter freundii* Biotype 4280 Is Necessary for Colonization in Transmissible Murine Colonic Hyperplasia. *Infect Immun* 61: 4654-4661.
278. Sengupta C, Ray S, Chowdhury R (2014) Fine tuning of virulence regulatory pathways in enteric bacteria in response to varying bile and oxygen concentrations in the gastrointestinal tract. *Gut Pathog* 6: 38.

Annexes

1. Annexe 1: méthodologie et résultats supplémentaires

1.1. Effect of intestinal compounds on the activity of the *ler* promoter

Several intestinal compounds were tested for their ability to modify the activity of the promoter of *ler*. The compounds were chosen based on literature and on the metabolic pathways differentially expressed in response to the metabolic activity of the intestinal microbiota. The screening of the compounds was realized β -galactosidase assays using the *Plee1:lacZ* transcriptional fusion. Using this technique we identify the Neu5Ac as a compound that diminish the activity of the *Plee1* promoter.

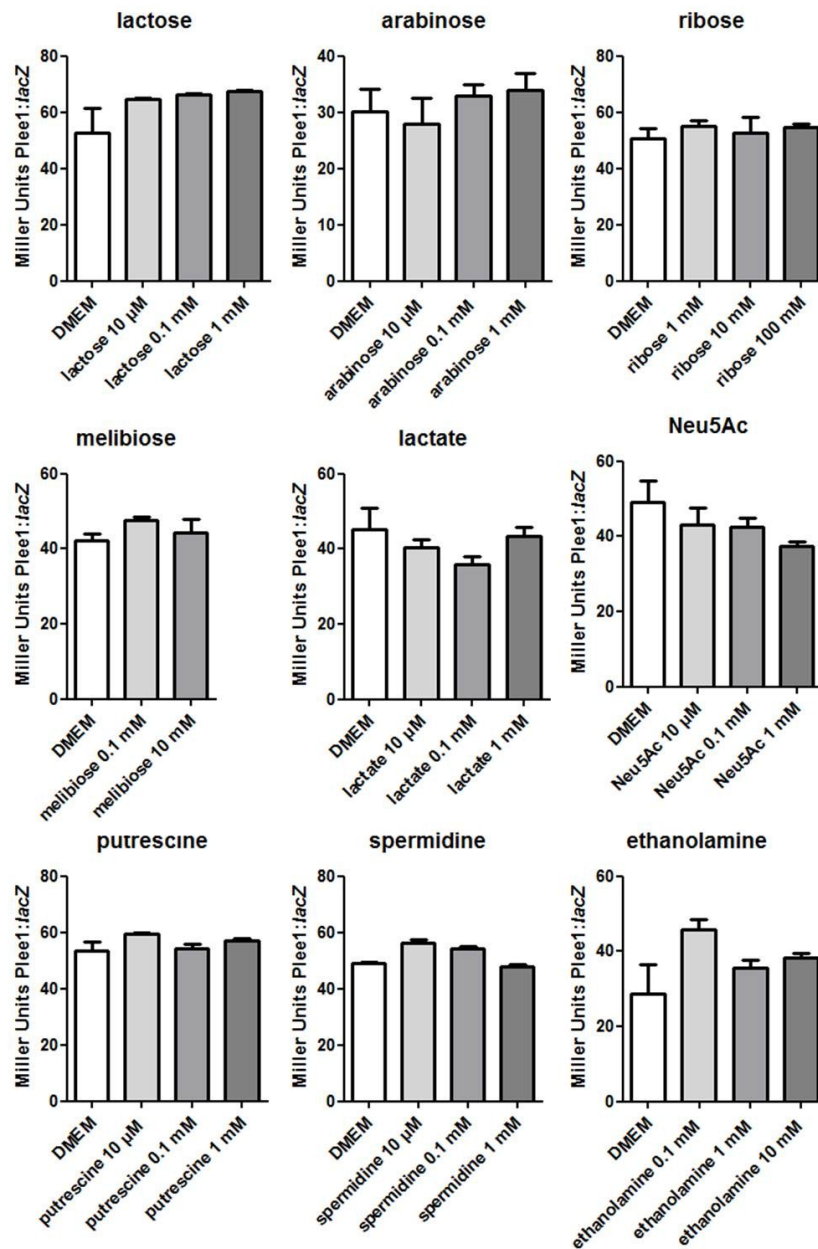


Figure 1. Screening of intestinal compounds for the ability to influence the activity of Plee1. β -galactosidase assays were performed in the DMEM medium with or without the addition of the compounds at concentrations ranging from 10 μ M to 10 mM. These are preliminary results and data are presented as Miller Units that are representative of the Plee1 activity.

1.2. Regulation of *z2210* by NagC

The expression of *z2210*, encoding for a putative sulfatase, was analysed by qRT-PCR in EDL933 incubated with or without GlcNAc 1 mM and in the Δ *nagC* and the Δ *nagC* complemented strain. Data showed that 1 mM GlcNAc significantly enhance the expression of *z2210*. Similarly, the deletion of *nagC* resulted in a significant up-regulation of *z2210*, whose expression was restored at the wild-type level in the Δ *nagC* complemented strain. Altogether, these results indicate that NagC is a transcriptional activator of *z2210*.

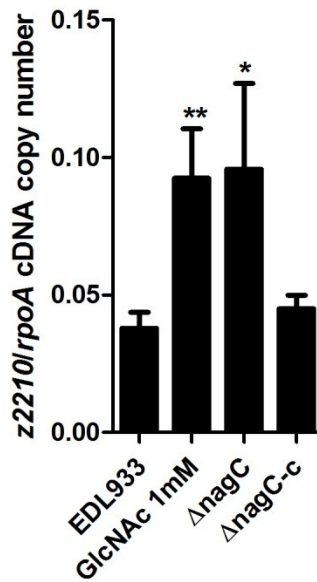


Figure 2. NagC is a transcriptional repressor of *z2210* encoding a putative sulfatase. qRT-PCR measurement of the expression of *z2210*, in the wild type strain EDL933 incubated with or without GlcNAc 1 mM, in the Δ *nagC* and the Δ *nagC* complemented strain. Results are shown as the ratio copy number of the tested gene / copy number of *rpoA* and are the means and standard errors from at least three independent experiments. Student's t-tests were performed to calculate p values. * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$.

1.3. Binding of NagC on the promoter of *ler*

1.3.1. Material and methods

1.3.1.1. Electrophoretic mobility shift assay

NagC was produced and purified by Genscript as follows. The NagC gene was cloned in a modified pGEX vector that contains a thrombin protease recognition site between the Glutathione S-Transferase (GST) tag and a multiple cloning site. Following the elution of NagC-GST using Glutathione Sepharose resin, the fused protein was cleaved by thrombin protease to remove the GST affinity Tag. The cleavage reaction was incubated again with Glutathione Sepharose 4B beads and the flow-through containing cleaved NagC was collected. The protein concentration was determined by Bradford protein assay with BSA as a standard, and the purity was about 80% as estimated by densitometric analysis of the Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel.

The EMSA reaction mix consisted of NagC at the desired concentration (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μ M), 50 nM final 6-FAM labeled probe, 0.1 mg/mL calf thymus DNA and 0.1 mg/mL BSA in EMSA buffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.02% v/v sodium azide). When required cold probes were added to the reaction mix. Reactions were incubated for 15 minutes at 25 °C, and then loaded onto a 4 % native agarose gel running at 120 V in 1x TBE buffer. Fluorescent bands were visualized using the Fusion Suite imaging scanner. The probe corresponding to the intergenic region of *nagB* and *nagE* (*pnagB-nagE*) was used as a positive control for NagC binding and the probe corresponding to the promoter of the kanamycin resistance gene (*pkan*) from the *pkD13* plasmid was used as a negative control. Competitions assays were performed between the cold and the labeled probes (ratio 1/1 or 10/1, cold/labeled) to control the binding specificity of NagC.

1.3.1.2. Footprinting

The intergenic region of *nagB* and *nagE* (296 bp) as well as the promoter of *ler* (317 bp) were end labeled with ^{32}P (125,000 cpm, 0.3 nM) and subsequently incubated in a total volume of 20 μl with 0.1 μg of calf thymus DNA and 0.1 μg of BSA. in binding buffer (60 mM Tris-HCl [pH 7.5], 40 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT). After incubation for 10 min at room temperature, 2 μl of DNase I (200 U/ml; New England BioLabs) containing 22 mM CaCl_2 and 22 mM MgCl_2 was added for 4 min (top fragment) and 6 min (bottom fragment). The reaction was stopped by the addition of 100 μl of stop buffer (10% glycerol, 2.5 mM EDTA, 0.6 M ammonium acetate, 2 mg yeast tRNA per ml) to each sample. DNA fragments were precipitated in ethanol, and amounts with equivalent cpm (5×10^4) from each reaction were loaded onto 6% polyacrylamide–7 M urea gels. Maxam-Gilbert A+G reactions were carried out on the appropriate ^{32}P -labeled DNA fragments, and the products loaded alongside the DNase I footprinting reaction mixtures. The gels were dried and analyzed by autoradiography.

1.3.2. Results

The binding ability of NagC on the promoter of *ler* was assessed by EMSA and by DNase footprinting. EMSA experiments using the probe corresponding to the intergenic region between *nagB* and *nagE* (*pnagB-nagE*) was used as a positive control for NagC binding. As shown in Figure 3A, NagC at 2.5 μM induced a shift of *pnagB-nagE*. This shift was removed by a competition with the cold probe *pnagB-nagE* using a ratio 10/1 (cold/labeled) and not by a competition with the cold probe *pkan* meaning that the binding of NagC to *pnagB-nagE* was specific. NagC at 7.5 μM induced a supershift of the labeled *pler* which was trapped in the well with the protein (Figure 3B). While the competition with the

cold probes *pnagB-nagE* or *pler* removed the labeled *pler* from the well, the competition with the cold *pnagB-nagE* probe did not. This suggests that the binding of NagC with *pler* is specific. However, given that we did not observe a clear shift on the gel and that NagC is known to form large aggregates that could non-specifically retain DNA fragments, this result is not convincing.

Footprinting experiments were performed with the *pnagB-nagE* and the *pler* probes (Figure 4). The two known NagC boxes were protected by NagC at 8 nM on the *pnagB-nagE* probe (Figure 4A). The upper protected sequence corresponds to TTAA**TT**TGCGATACG**AA**TTAAA and the lower corresponds to CTTAT**TT**TATCATTCA**AAA**AATC, with in bold the conserved “TT” and “AA” motifs spaced by nine bases. The interaction of NagC with the *pler* probe resulted in three NagC-protected regions (protected 1 to protected 3) with the region named “protected 1” containing the putative NagC box that we identified by analysing the promoter of *ler* (GTAT**TT**TACACATTAG**AAAA**AAG) (Figure 4B and 4C). The regions protected 2 and protected 3 did not correspond to a NagC box since they do not contain the “TT” and “AA” motifs spaced by nine bases (Figure 4C). This means that NagC binds non-specifically to the promoter of *ler*. Moreover, the NagC protected regions were observed with high concentrations of NagC (> 500 nM) meaning that NagC binds with a low affinity to the *ler* promoter. Consequently, these results did not validate the direct interaction of NagC with the promoter of *ler*.

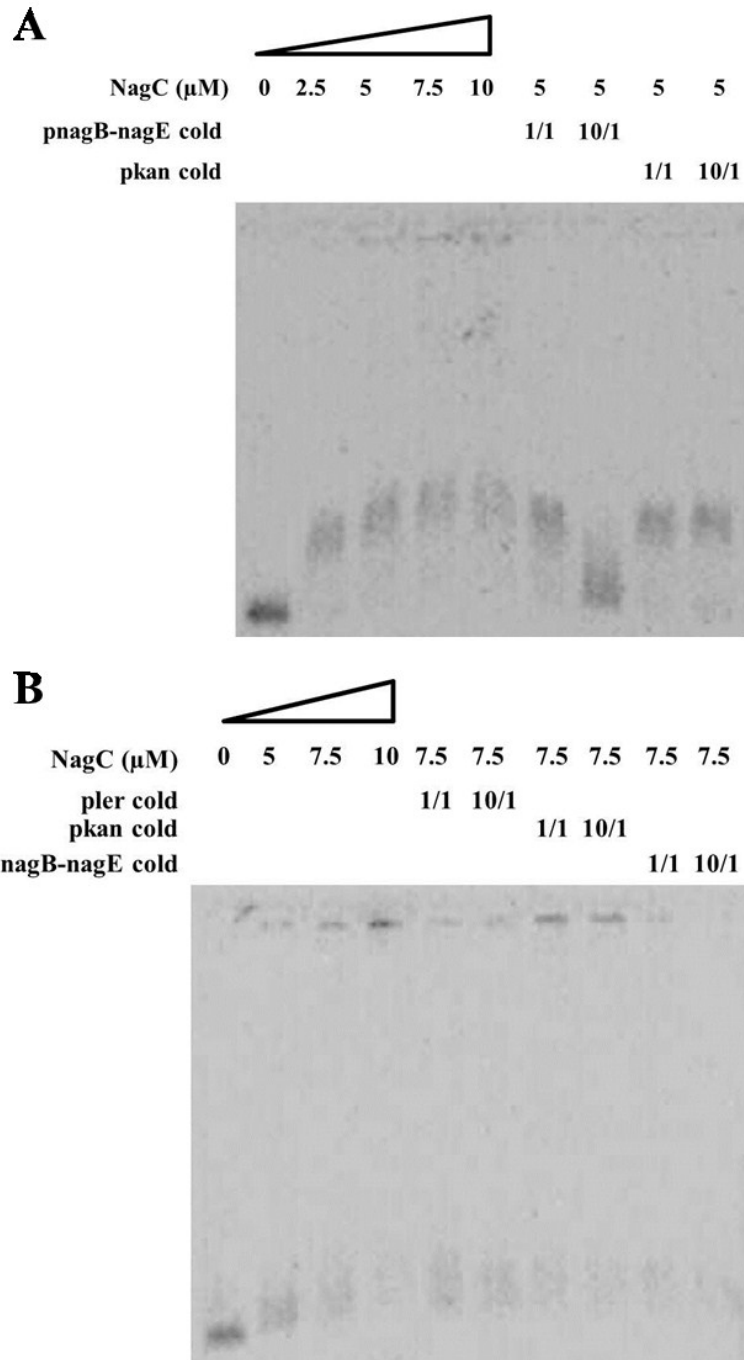


Figure 3. Binding of NagC to the promoter of *ler*. (A) Binding of NagC to the positive control probe *pnagB-nagE* and competition assays with the cold *pnagB-nagE* probe and the cold *pkan* probe using ratio 1/1 or 10/1 (cold/labeled). (B) Binding of NagC to the *pler* probe. Competition assays were performed with the cold *pnagB-nagE* probe, the cold *pkan* probe and the cold *pler* probe using ratio 1/1 or 10/1 (cold/labeled).

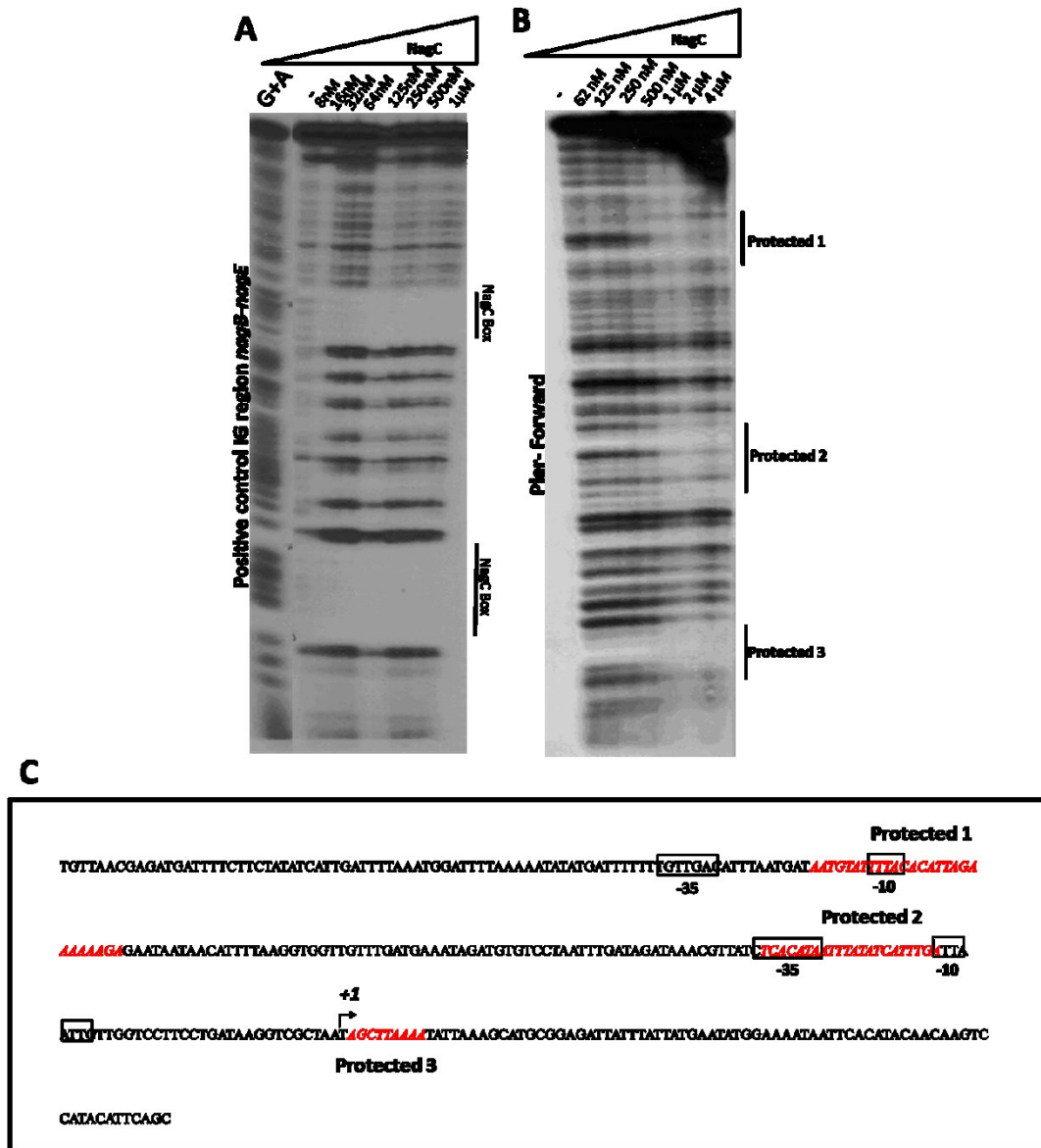


Figure 4. DNase footprinting assays. (A) NagC localization on the *pncB-nagE* regulatory region (1st lane, Maxam-Gilbert A G reactions; 2nd lane, DNA alone; lane 3 to 8, increasing amount of NagC). Known NagC boxes are indicated (B) NagC localization on the promoter of *ler* (1st lane, DNA alone; lane 2 to 7, increasing amount of NagC). DNase protected regions on the promoter of *ler* are named “protected 1 to 3”. (C) DNA sequence of the promoter of *ler* with the DNase protected regions indicated in red. The -35 and -10 boxes and +1 transcribed base are indicated.

2. Annexe 2: Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain

En tant que troisième auteur de cet article de recherche, j'ai réalisé plusieurs expériences telles que des tests de phosphatase alcaline, des tests de résistance au sérum ainsi que des tests d'agrégation aux levures. J'ai également contribué à la correction de l'article avant soumission.

Increased Pho Regulon Activation Correlates with Decreased Virulence of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain[∇]

Nicolas Bertrand,¹ Sébastien Houle,² Guillaume LeBihan,¹ Édith Poirier,¹
Charles M. Dozois,^{1,2} and Josée Harel^{1*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP),
Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6,¹ and
INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7²

Received 1 May 2010/Returned for modification 5 June 2010/Accepted 26 September 2010

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains are associated with respiratory infections, septicemia, cellulitis, peritonitis, and other conditions, since colibacillosis manifests in many ways. The Pho regulon is jointly controlled by the two-component regulatory system PhoBR and by the phosphate-specific transport (Pst) system. To determine the specific roles of the PhoBR regulon and the Pst system in the pathogenesis of the APEC O78 strain χ 7122, different *phoBR* and *pst* mutant strains were tested *in vivo* in chickens and *in vitro* for virulence traits. Mutations resulting in constitutive activation of the Pho regulon rendered strains more sensitive than the wild type to hydrogen peroxide and to the bactericidal effects of rabbit serum. In addition, production of type 1 fimbriae was also impaired in these strains. Using a chicken competitive infection model, all PhoB constitutive mutants were outcompeted by the wild-type parent, including strains containing a functional Pst system. Cumulative inactivation of the Pst system and the PhoB regulator resulted in a restoration of virulence. In addition, loss of the PhoB regulator alone did not affect virulence in the chicken infection model. Interestingly, the level of attenuation of the mutant strains correlated directly with the level of activation of the Pho regulon. Overall, results indicate that activation of the Pho regulon rather than phosphate transport by the Pst system plays a major role in the attenuation of the APEC O78 strain χ 7122.

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) O78:K80:H9 strain χ 7122 is involved in the development of colisepticemia, cellulitis, and respiratory disease, and it belongs to one of the most prevalent serogroups that cause avian colibacillosis (13). In addition, APEC is a subset of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and shares virulence traits with strains isolated from human cases of neonatal meningitis, urinary tract infections, and septicemia. Thus, APEC strains represent a high risk of zoonotic infection (23), and their virulence gene pool may contribute to emergence of other ExPEC strains (16).

Bacterial pathogens use specific mechanisms to mediate adaptive responses to the different environments and stresses encountered within the host (34). As a result, this dynamic process leads to adaptation and survival in different niches during infection. Bacteria use two-component regulatory systems (TCRS) to translate environmental stimuli into expression of a highly precise response (36). The PhoBR TCRS present in many bacterial species responds to external phosphate concentrations and controls gene transcription of the Pho regulon (51). The activation signal, phosphate-limiting conditions, promotes the autophosphorylation of the sensor kinase PhoR (33). Then, the phosphoryl group is transferred to its cognate response regulator, PhoB (32). In its activated state, PhoB binds to consensus sequences in the upstream regions of

Pho-dependent genes, the Pho boxes, where it regulates transcription through interaction with RNA polymerase associated with σ^{70} (2, 31).

The *pst* operon belongs to the Pho regulon. The Pst system consists of a high-affinity ABC transporter of inorganic phosphate (P_i), which includes a periplasmic P_i binding protein (PstS), two membrane permeases (PstA and PstC), an ATPase (PstB), and PhoU (41, 47). Moreover, the molecular mechanisms that lead to turning off the Pho regulon involve the Pst system. Indeed, most mutations in the Pst system result in constitutive expression of the Pho regulon, regardless of environmental phosphate concentrations (51). Furthermore, it is well recognized that inactivation of the Pst system, constitutive expression of the Pho regulon, and bacterial virulence are linked in diverse bacterial species (28). In APEC strain χ 7122, deletion of the *pstCAB* genes was shown to reduce virulence in a chicken infection model and to affect multiple virulence attributes, including production of type 1 fimbriae and resistance to cationic peptides, to the bactericidal effects of rabbit serum, to acid shock, and to oxidative stress (10, 26). Transcriptional analyses demonstrated the induction of a general stress response in the *pst* mutant, including increased expression of genes involved in adaptation to acid stress, oxidative stress, and the general stress response (notably RpoS-regulated genes). In addition, genes associated with cell surface composition were modulated (10). Since the Pst system contributes both to regulation of the Pho regulon and to high-affinity uptake of P_i, it remains to be determined if the effects of Pst inactivation on APEC virulence are mediated through the PhoBR TCRS or deficiency in phosphate uptake (28).

Hence, the purpose of this investigation was to test the

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521, ext. 8233. Fax: (450) 778-8108.

[∇] Published ahead of print on 4 October 2010.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strain or description		
DH5 α	F ⁻ λ ⁻ ϕ 80 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JWK0389_1	K12 Δ <i>phoB::kan</i>	1
JWK3705_1	K12 Δ <i>pstC::kan</i>	1
χ 7122	APEC O78:K80:H9 <i>gyrA</i> Nal ^r	40
Δ <i>phoB</i>	χ 7122 Δ <i>phoB::kan</i>	This work
Δ <i>pstC</i>	χ 7122 Δ <i>pstC::FRT</i>	This work
Δ <i>pstC::kan</i>	χ 7122 Δ <i>pstC::kan</i>	This work
Δ <i>pstC</i> Δ <i>phoB</i>	χ 7122 Δ <i>phoB::kan</i> / Δ <i>pstC::FRT</i>	This work
<i>phoR</i> (T220N)	χ 7122 <i>phoR</i> (T220N)	This work
Δ <i>pstCAB</i>	χ 7122 Δ <i>pstCAB::kan</i>	26
Δ <i>pstCAB</i> + pAN92	χ 7122 Δ <i>pstCAB::kan</i> + pAN92	26
Δ <i>pstC</i> + pAN92	χ 7122 Δ <i>pstC::FRT</i> + pAN92	This work
MGN-617	SM10 λ <i>pir</i> derivative, <i>thi thr leu tonA lacY supE</i> λ <i>pir recA::RP4-2-Tc::Mu</i> (Kan ^r) Δ <i>asdA1</i>	24
χ 7279	χ 7122 Δ <i>fim</i>	10
862	ExPEC O115:K, serum sensitive	11
QT51	χ 7122 Δ <i>lacZ</i>	30
Plasmids		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> Cm ^r Ap ^r	S. Tinge, Megan Health
pCP20	<i>FLP</i> ⁺ λ c1857 ⁺ λ p _{tr} Rep(Ts) Ap ^r Cm ^r	9
pKM200	<i>Ptac-gam-bet-exo</i> operon from pTP806	Kenan Murphy
pGEMO-T	pGEMR-5Zf(+) vector with EcoRV at base 51, with a T added to both 3' ends	Promega
pAN92	pACYC184: <i>pst</i> operon, Cm ^r	21

hypothesis that the PhoBR TCRS, rather than the Pst system, is critical to the virulence of APEC. To that end, a series of mutants in the *pst* and *phoB* operons of the APEC O78:K80:H9 strain χ 7122 were generated and were tested for expression of the Pho regulon and for various attributes of virulence. We report here that constitutive activation of the Pho regulon, through the PhoBR TCRS, is responsible for attenuation of APEC χ 7122 virulence. Moreover, the activation level of the Pho regulon correlates with decreased virulence in this pathogenic *E. coli* strain. In addition, we have demonstrated that the PhoB regulator, which is critical for activation of the Pho regulon, is not required for virulence of APEC in the chicken infection model.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, primers, and media. The *E. coli* strains and plasmids used for this study are listed in Table 1. Primers used for PCR amplifications are listed in Table 2. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C. LB broth is a high-phosphate medium. Low-P_i (LP) broth was used for alkaline phosphatase assays and to determine sensitivity to hydrogen peroxide. LP broth is composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM MgSO₄, 0.1% yeast extract, 20 mM glucose, and 1 mM methionine. For experimental infections of chickens, beef heart infusion broth and MacConkey-lactose agar plates were used. Antibiotics or supplements were

used at the following final concentrations, when required: chloramphenicol (Cm), 12.5 μ g/ml; kanamycin (Kan), 50 μ g/ml; nalidixic acid (Nal), 40 μ g/ml; and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (XP or BCIP), 40 μ g/ml.

Generation of the *phoR*(T220N) mutant by allelic exchange. Site-specific mutagenesis of *phoR* was used to generate a mutant in which the Pho regulon is constitutively active (51). *E. coli* strain DH5 α was used for cloning experiments with pGEM-T. A first PCR fragment was amplified from the wild-type strain, χ 7122, using the primers *phoR*-Fext and *phoR*-Rint (which contain the desired point mutation). A second PCR fragment was amplified from strain χ 7122 using the primers *phoR*-Rext and *phoR*-Fint (which also contains the desired point mutation). The 2 PCR fragments were used as a template to amplify a full *phoR*(T220N) PCR fragment using the *phoR*-FSacI and *phoR*-RSacI primers, which both contain SacI restriction sites. This final PCR product was ligated into the SacI site of pGEM-T. This construct was digested with SacI, and the *phoR*(T220N) fragment was ligated into the SacI site of the suicide vector pMEG-375. The resulting construct was transferred to strain MGN-617 and was then mobilized in χ 7122 by conjugation. Single-crossover integrants of strain χ 7122 were selected on LB agar containing appropriate antibiotics (XP, Nal, and Cm). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counterselection on LB agar plates without NaCl but containing 5% sucrose (25), XP, and Nal. The mutant strain was confirmed to contain the desired point mutation *phoR*(T220N) and no other nucleotide changes, as determined by sequencing.

Construction of mutant derivatives of APEC strain χ 7122. *phoB* and *pst* knockout mutants were obtained by homologous recombination using the λ *red* recombinase method (12). Briefly, the Δ *phoB::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK0389_1 was used to introduce a Δ *phoB* mutation into χ 7122 using the *phoB*-Fext and *phoB*-Rext primers, generating strain χ 7122 Δ *phoB::kan*. The Δ *pstC::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK3705_1 was used to introduce the Δ *pstC* mutation into χ 7122 with the *pstC*-Fext and *pstC*-Rext primers, generating the χ 7122 Δ *pstC::kan* strain. Then, the χ 7122 Δ *pstC::FRT* strain was generated by FLP-mediated excision of the kanamycin cassette from χ 7122 Δ *pstC::kan* by using the plasmid pCP20 (12). To create the Δ *pstC* Δ *phoB* double mutant, the Δ *phoB::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK0389_1 was used to introduce the Δ *phoB* mutation into the χ 7122 Δ *pstC::FRT* background, generating χ 7122 Δ *pstC* Δ *phoB*. Mutations were confirmed by PCR and sequencing, using primers flanking the specific gene region. Restoration of the Pst system in the χ 7122 Δ *pstC::FRT* mutant was achieved by complementation with plasmid pAN92, which contains a functional *pst* operon.

Alkaline phosphatase assay. Alkaline phosphatase was measured as described previously (4, 26). Briefly, 4 μ g/ml of *p*-nitrophenyl phosphate was added to 500 μ l of mid-log-phase (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of 0.6) culture cells

TABLE 2. Primers used for PCR amplifications

Primer	Sequence
<i>phoR</i> -Fext	5'-GTGCGCGGTACAGGATATCGTTTTTCAACC-3'
<i>phoR</i> -Rint	5'-AGGTAACCCGTAAACACGTTCAATGGCGTAC-3'
<i>phoR</i> -Rext	5'-CAGTCAGTATGACAGCACCTGAAGCGCAAT-3'
<i>phoR</i> -Fint	5'-CGTACGCCATTGAACGCTGTACAGGGTTACC-3'
<i>phoR</i> -FSacI	5'-GAGCTCGGAATTTATTGGCGCTTTCATGG-3'
<i>phoR</i> -RSacI	5'-CTCGAGTCAGGCGACTTTCCGTGATGATTC-3'
<i>phoB</i> -Fext	5'-ACCTGAAGATATGTGCGACGAGCTT-3'
<i>phoB</i> -Rext	5'-CGTTCAGCACGTAAGATACTCCAG-3'
<i>pstC</i> -Fext	5'-CAGAACAAAGGCACAGAAGTGCTGA-3'
<i>pstC</i> -Rext	5'-GGGTAGCGGCTGTAATTTGTG-3'

permeabilized by 50 μ l of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50 μ l of chloroform. Color development was monitored at 420 nm, and alkaline phosphatase activity was expressed in enzyme units per minute, calculated as follows: $1,000 \times [OD_{420} - (1.75 \times OD_{550})]/T \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times OD_{600}$, where T stands for the length of reaction time and V stands for the culture cell volume.

Sensitivity of *E. coli* strains to hydrogen peroxide. Sensitivity to hydrogen peroxide-induced oxidative stress was determined by an agar overlay diffusion method on LB or LP plates (1.5% agar) as described previously (3, 43), with some modifications (10). Overnight cultures grown in LB or LP broth were adjusted to an OD_{600} of 0.5. One hundred microliters of each culture was suspended in 4 ml of LB or LP molten top agar (0.5% agar) and poured over the LB or LP agar plates. Sterile blank disks were added to the surfaces of the solidified overlays, and 10 μ l of hydrogen peroxide (30%) was spotted onto the disks. The plates were then incubated overnight at 37°C, and following growth, the diameters of inhibition zones were measured.

Serum bactericidal assay. The serum bactericidal assay was adapted from the method of Taylor and Kroll (48) as described previously (26). Briefly, bacteria were grown overnight in LB broth at 37°C. Bacterial cultures were then resuspended in fresh medium at a 10-fold dilution, incubated at 37°C, and harvested during the mid-log phase (OD_{600} of 0.6). Bacteria were washed at room temperature with gelatin-Veronal-buffered saline (pH 7.35) and then resuspended to a concentration of 10^7 CFU/ml. A volume of 0.1 ml of the bacterial suspension was added to 0.9 ml of normal rabbit serum and then incubated at 37°C. Viable cell counts were determined at 0, 1, 2, and 3 h by spreading dilutions of the suspension on LB agar plates. The survival rate was calculated as the CFU determined at each time point divided by the initial CFU present at time zero.

Yeast cell aggregation assay. To test the production of type 1 fimbriae, manose-sensitive yeast agglutination assays were performed. The yeast aggregation assay was derived from a microhemagglutination assay in 96-well round-bottom plates (40) as described previously (10). Briefly, cultures were grown to mid-log phase (OD_{600} of 0.6) in LB broth at 37°C without shaking to enhance expression of type 1 fimbriae. Bacterial cells were centrifuged, and pellets were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) to an initial suspension of approximately 3×10^{10} CFU/ml. Samples were then serially diluted 2-fold in microtiter wells, and equal volumes of a 3% commercial yeast suspension were added to each of the wells. After 1 h of incubation on ice, yeast aggregation was monitored visually, and the agglutination titer was recorded as the most diluted bacterial sample giving a positive aggregation reaction. The Δfim type 1 fimbria mutant strain $\chi 7279$ (10) was used as a negative control.

Experimental infection of chickens via the air sacs. A competitive coinfection model was used as described previously (43), with some modifications. Strains were prepared from a diluted 24-h beef heart infusion broth culture, and equal quantities (5×10^6 CFU) of each mutant strain and a virulent $\Delta lacZYA$ derivative of strain $\chi 7122$, strain QTS1, were used as the 100- μ l inoculum. Use of QTS1 in coinfections permitted a direct evaluation of the number of colonies of QTS1 (Lac⁻ colonies) compared to the isogenic mutants (Lac⁺ colonies) on each plate. All birds were euthanized at 48 h postinfection and were then necropsied. Organs were removed aseptically. Blood samples and the right lung, liver, and spleen of each animal were weighed, suspended in PBS, and homogenized. Dilutions of homogenates were plated onto MacConkey-lactose agar plates with appropriate antibiotics for bacterial quantification. Several randomly selected colonies per organ were verified by PCR. The competitive index (CI) was calculated as the number of CFU/g of the mutant strain divided by the number of CFU/g of strain QTS1 in each tissue or blood sample divided by the same ratio in the initial input inoculum.

Coculture. Coculture was performed as described previously (6, 20), with some modifications. Briefly, equal quantities (5×10^6 CFU) of the QTS1 $\Delta lacZYA$ derivative of strain $\chi 7122$ and either mutant strain were used from overnight LB cultures to initiate the coculture in 5 ml of fresh LB medium without antibiotics. Cocultures were incubated at 37°C with shaking. Viable counts (in CFU) were determined for the input time points, 24 and 48 h, by plating dilutions onto MacConkey-lactose agar plates without antibiotics. The coculture ratio was calculated as the CFU of the QTS1 mutant strain (Lac⁻) divided by the CFU of the competitor mutant strain (Lac⁺) divided by the same ratio in the initial input inoculum.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using the Prism 4.03 software package (GraphPad Software). A paired one-tailed Student t test was used to determine significant differences for alkaline phosphatase activity, sensitivity to hydrogen peroxide, and yeast cell aggregation assays. Analysis of variance followed by Tukey's multiple-comparison test was used for the serum assays. For the coinfection experiments, geometric means of the CIs were determined, and a Student t test (two-tailed) was used to determine whether the

TABLE 3. Alkaline phosphatase activities of $\chi 7122$, isogenic mutants, and complemented strains in high (LB)- or low (LP)-phosphate medium

Strain name or description	Alkaline phosphatase activity (arbitrary units \pm SD) in ^a :	
	LB	LP
$\chi 7122$	2.4 \pm 1.2	82.6 \pm 6.4
$\Delta pstCAB$	134.7 \pm 26.8*	180.2 \pm 9.6*
$\Delta pstC$	33.8 \pm 5.3	119.6 \pm 11.1
<i>phoR</i> (T220N)	19.3 \pm 3.5	70.7 \pm 5.8
$\Delta phoB$	1.4 \pm 2.2	1.9 \pm 2.1
$\Delta pstC \Delta phoB$	3.1 \pm 2.1	2.8 \pm 1.3
$\Delta pstCAB$ + pAN92	2.7 \pm 1.5	75.7 \pm 12.1
$\Delta pstC$ + pAN92	4.2 \pm 3.5	76.3 \pm 11.8

^a Data presented are the means \pm the standard deviations of three independent experiments. Values indicated in bold text are significantly different ($P < 0.05$) from the mean for the wild-type strain as calculated by Student's t test. Values marked with asterisks are significantly different ($P < 0.05$) from the mean for every other strain as calculated by Student's t test.

logarithmically transformed ratios differed significantly from 0 (14). P values below 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

To distinguish between the specific contributions of the PhoBR TCRS and the Pst system for APEC virulence, we used a series of *pst* and *phoBR* mutant derivatives of APEC O78 strain $\chi 7122$ (Table 1). Both $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants were complemented with the plasmid pAN92, containing a functional *pst* operon, restoring wild-type alkaline phosphatase (AP) activities. However, we were unable to restore a wild-type phenotype in the *phoR*(T220N) mutant, which demonstrates constitutive expression of the Pho regulon, by introducing a *phoBR*-carrying plasmid. This is likely due to dominance of *phoR*(T220N) over the wild-type copy of the *phoR* gene. The growth kinetics of the mutants and complemented strains under low or high concentrations of phosphate were similar to that of the wild-type strain (data not shown).

To determine the activation status of the Pho regulon in our mutants, the AP activities of strains were measured under phosphate-limiting and high-phosphate conditions (Table 3). The AP encoded by *phoA*, a member of the Pho regulon, is widely used as an indicator to monitor the level of expression of the Pho regulon (8, 17, 20, 26). Under high-phosphate conditions, the wild-type strain demonstrated a minimal baseline of AP production. On the other hand, $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$, and *phoR*(T220N) mutants produced AP constitutively ($P < 0.05$) compared to the wild-type parent strain, $\chi 7122$ (Table 3). Among the constitutive AP-producing mutants, there was a stronger induction of the Pho regulon in the $\Delta pstCAB$ mutant ($P < 0.05$) (Table 3). In low-phosphate medium, the AP production of the wild-type strain was activated, although the AP activities of $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants were higher than the wild-type strain ($P < 0.05$). AP production in the $\Delta pstCAB$ mutant was markedly elevated compared to that in all other strains ($P < 0.05$) when grown in low-phosphate medium. In contrast, the AP activity of the *phoR*(T220N) mutant was similar to that of the wild-type strain. In the $\Delta phoB$ and $\Delta pstC \Delta phoB$ mutants, no AP activity was observed under either high-phosphate or low-phosphate conditions, indicating that

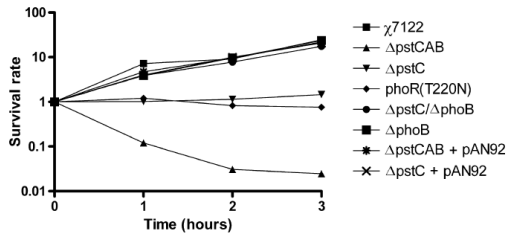


FIG. 1. Bacterial resistance to serum for APEC χ 7122, isogenic mutants, and complemented strains. Data presented are the means of results from three independent experiments. The survival rates were measured in 90% rabbit serum for various periods of time. Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122 and the Δ pstCAB, Δ pstC, phoR(T220N), Δ phoB, Δ pstC Δ phoB, Δ pstCAB + pAN92, and Δ pstC + pAN92 strains. The survival rate of the Δ pstCAB mutant strain was significantly lower than the survival rates of every other strain at each time point. From 2 to 3 h of exposure to rabbit serum, the Δ pstC and phoR(T220N) strains were significantly more sensitive to serum than the wild-type strain. No significant differences were observed between the wild-type χ 7122 strain and the Δ pstC Δ phoB, Δ phoB, Δ pstCAB + pAN92, and Δ pstC + pAN92 strains. The control strain, 862, did not survive after 1 h of exposure to 90% rabbit serum (data not shown). Analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical analyses ($P < 0.05$).

the Pho regulon is inactivated in these strains. Consequently, the activation of the Pho regulon in the Δ pstC mutant is therefore phoB dependent. Taken together, results demonstrate that there are different degrees of Pho regulon activation due to introduction of the different pst- and phoBR-specific mutations.

Virulence determinants. To determine whether the Pst system and the Pho regulon contribute to resistance to serum, we tested the ability of the strains to survive in 90% rabbit serum (Fig. 1). The wild-type χ 7122 strain multiplied in serum and was considered serum resistant. The Δ pstCAB mutant was rapidly killed by rabbit serum and was significantly more sensitive to serum than all other strains at each time point ($P < 0.05$). The bacterial counts of the Δ pstC and phoR(T220N) mutants showed a significant decrease compared to that of the wild-type strain after 2 and 3 h ($P < 0.05$). In addition, Δ phoB, Δ pstC Δ phoB, and complemented strains were as resistant to serum as the parent strain, χ 7122. The serum-sensitive control strain, 862, did not survive after 1 h of exposure to 90% rabbit serum (data not shown).

To assess the effects of a pst mutation and Pho regulon activation on APEC strain χ 7122 for production of type 1 fimbriae, we used a yeast cell agglutination assay (Fig. 2). Yeast cells are rich in mannose surface molecules, which are recognized by the type 1 fimbrial adhesin. The Δ pstCAB strain did not produce agglutination at the highest bacterial titer ($P < 0.05$). The minimal bacterial titer allowing yeast agglutination was higher for the phoR(T220N) and Δ pstC mutants than for the wild-type strain ($P < 0.05$). On the other hand, no differences were observed with the Δ phoB and Δ phoB Δ pstC mutants, which agglutinated at titers comparable to that of the wild-type parent. Complementation of the Δ pstCAB and Δ pstC mutants restored yeast agglutination titers to wild-type levels, which corresponds to a restoration in production of type 1

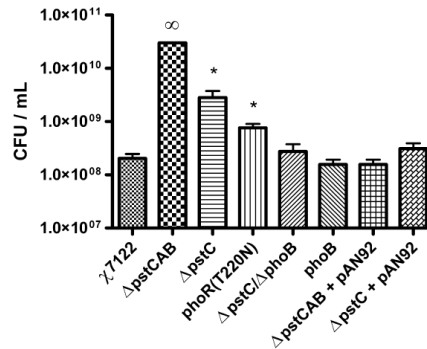


FIG. 2. Minimal bacterial titers allowing yeast agglutination of APEC χ 7122, isogenic mutants, and complemented strains. Data presented are the means \pm the standard deviations of results from three independent experiments. Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122 and the Δ pstCAB, Δ pstC, phoR(T220N), Δ phoB, Δ pstC Δ phoB, Δ pstCAB + pAN92, and Δ pstC + pAN92 strains. The χ 7122 Δ fim (χ 7279) strain was used as a negative control. The "∞" symbol shows no agglutination was observed at the highest cell titer for the Δ pstCAB strain, which was also observed for Δ fim strain χ 7279 (data not shown). Asterisks indicate significant differences observed between bacterial titers of the wild-type χ 7122 strain and both the Δ pstC and phoR(T220N) mutant strains ($P < 0.05$) as calculated by Student's t test.

fimbriae. The χ 7122 Δ fim (χ 7279) strain was used as a negative control and did not show agglutination of yeast cells (data not shown).

To investigate the role of the Pst system and the Pho regulon in sensitivity to hydrogen peroxide, we used the H₂O₂ agar overlay diffusion method (Table 4). Under phosphate-sufficient conditions (LB), diameters of inhibition zones were significantly larger with Δ pstCAB, Δ pstC, and phoR(T220N) mutants than with the parent strain, χ 7122 ($P < 0.05$). The PhoR mutant demonstrated a smaller diameter of sensitivity, suggesting that this strain was slightly more resistant to hydrogen peroxide than the other Pho constitutive mutants, although this difference was not statistically significant. Complementation of the Δ pstCAB and Δ pstC mutants restored the wild-type

TABLE 4. Growth inhibition zones of APEC χ 7122, isogenic mutants, and complemented strains with hydrogen peroxide

Strain name or description	Growth inhibition zone (mm) in ^a :	
	LB	LP
χ 7122	17.7 \pm 0.6	33.5 \pm 0.6
Δ pstCAB	21.3 \pm 0.6	34.8 \pm 0.4
Δ pstC	21.0 \pm 0.5	34.2 \pm 0.8
phoR(T220N)	20.1 \pm 0.4	35.8 \pm 1.7
Δ phoB	18.3 \pm 0.6	39.7 \pm 0.5
Δ pstC Δ phoB	18.6 \pm 0.5	38.8 \pm 1.7
Δ pstCAB + pAN92	18.7 \pm 0.6	36.5 \pm 1.0
Δ pstC + pAN92	18.4 \pm 0.6	34.5 \pm 0.8

^a Data presented are the means \pm standard deviations for six independent experiments. The compound used was 10 μ l of H₂O₂ (30% [vol/vol]) on LB or LP agar plates. Values indicated in bold text are significantly different ($P < 0.05$) from the mean for the wild-type strain as calculated by Student's t test.

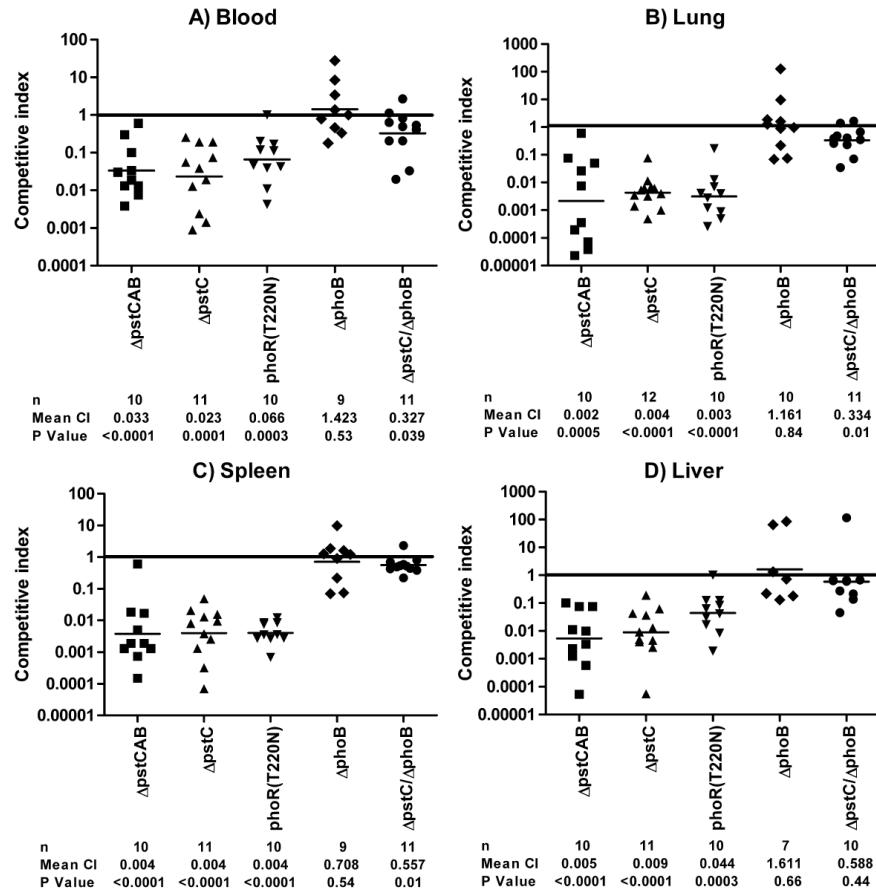


FIG. 3. Competitive indexes from different organs of chickens coinfected with APEC χ 7122 isogenic mutants and virulent χ 7122 Δ lacZYA derivative strain QT51. Mixtures of each of the χ 7122 isogenic mutants and the virulent χ 7122 Δ lacZYA derivative strain QT51 were inoculated in 3-week-old pathogen-free chickens. At 48 h postinfection, heart blood (A), lungs (B), spleens (C), or livers (D) were collected, and bacterial counts were determined. Results are shown as CI values (mutant/strain QT51) and normalized for the inoculum. CI values lower than 1 indicate a decreased capacity for the mutant to compete with the virulent test strain. Horizontal bars indicate the geometric mean CI values. Each point represents a CI value from a blood or tissue sample from an individual chicken. The table summarizes the number of animals sampled (n), the geometric mean of the CI (Mean CI), and the P value from a two-tailed t test. Asterisks indicate that logarithmically transformed CIs differed significantly from 0 ($P < 0.05$). The Δ pstCAB, Δ pstC, $phoR(T220N)$, Δ phoB, and Δ pstC Δ phoB strains were tested.

phenotype. On the other hand, there was no difference in measurements of inhibition zones in response to H_2O_2 with the Δ phoB and Δ pstC Δ phoB mutants from that with the wild-type parent strain χ 7122. The results in low-phosphate medium showed that χ 7122 cultured in LP has the same sensitivity pattern as the Δ pstCAB, Δ pstC, and $phoR(T220N)$ Pho constitutive strains. In addition, the Δ phoB and Δ pstC Δ phoB mutants exhibited an increased sensitivity to H_2O_2 .

Competitive coinfection model for APEC virulence. To investigate the importance of a *pst* mutation, as well as Pho regulon activation, for the virulence of APEC, we used a competitive coinfection model (Fig. 3). In experimental coinfection

of chickens, the bacterial counts isolated from blood samples, lung, spleen, and liver were significantly reduced for the Δ pstCAB, Δ pstC, and $phoR(T220N)$ mutants ($P < 0.05$) 48 h postinfection. However, regarding the $phoR(T220N)$ mutant, there was a less marked decrease in the CI for liver (0.044) and blood (0.066) compared to those of both the Δ pstCAB and Δ pstC mutants. On the other hand, the wild-type strain QT51 significantly outcompeted ($P < 0.05$) the Δ pstC Δ phoB mutant in lung, blood, and spleen samples but not in liver samples. Nevertheless, the means of the CI of the double Δ pstC Δ phoB mutant in lung (0.344), blood (0.327), and spleen (0.577) tissue were considerably higher than those of the

TABLE 5. *In vitro* competition assays of APEC χ 7122 isogenic mutants versus χ 7122 Δ lacZYA derivative strain QT51

Genotype of competitor strain	Normalized coculture ratio ^a	
	24 h	48 h
Δ pstCAB	4.7 \pm 1.8	12.3 \pm 4.3
Δ pstC	3.3 \pm 0.7	4.1 \pm 0.4
Δ phoR	1.6 \pm 0.4	1.9 \pm 0.7
Δ phoB	1.3 \pm 1.1	0.6 \pm 0.4
Δ pstC Δ phoB	1.4 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2

^a Data presented are the means \pm standard deviations for three independent experiments. Equal quantities of χ 7122 Δ lacZYA derivative strain QT51 and either mutant were grown in LB coculture. Viable counts (in CFU) were determined for the input time point, 24 or 48 h, by plating dilutions on MacConkey-lactose agar plates without antibiotics. The coculture ratio was calculated as the CFU of the QT51 mutant strain divided by the CFU of the competitor strain divided by the same ratio in the initial input inoculum.

Δ pstCAB, Δ pstC, and Δ phoR(T220N) mutants (Fig. 3 B to D). In contrast, the Δ phoB mutant was as virulent as the wild-type strain in all tissues and blood. To determine whether the out-competition observed *in vivo* was due to different growth characteristics, we performed an *in vitro* competition (Table 5). At 24 and 48 h, there was a less than 1 log difference in the amount of mutants present compared with that of the wild-type derivative QT51 strain except that at 48 h, there was slightly more than 1 log difference between the Δ pstCAB mutant and QT51. However, these results do not account for the dramatic decreases in recovery observed for the mutants (up to nearly 3 logs) compared with the 48-h *in vivo* cochallenge.

DISCUSSION

In *E. coli* and many other bacterial species, the Pho regulon is activated when cells face phosphate limitation, whereas its expression is inhibited when phosphate levels are replete. The Pho regulon is an important part of a complex network that encompasses not only phosphate homeostasis but also adaptive responses to stress and altered regulation of a diversity of genes, including virulence factors (5, 10, 20, 26). In our study, we dissected the specific contributions of both the PhoBR two-component regulatory and Pst systems to virulence of an APEC O78 strain. Taken together, our results indicate that constitutive Pho regulon activity, through the PhoBR TCRS, is largely responsible for APEC attenuation. This statement is based on the fact that all Pho constitutive mutants were affected in every *in vivo* and *in vitro* assay. On the other hand, it is possible that a functional Pst system may provide a slight *in vivo* advantage, since the Δ phoR(T220N) mutant is less attenuated *in vivo* than the Δ pstCAB and Δ pstC mutants. Also, a basal level of expression of the *pst* genes may explain why the Δ pstC Δ phoB mutant has a small but significant influence on virulence *in vivo* whereas the Δ phoB mutant is not affected.

Our findings are in conformity with previous observations. For example, a recent study reported that Pst contributes to the virulence of atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and *Citrobacter rodentium* through the response regulator PhoB (8). Indeed, they showed that adherence attenuation phenotypes in *pst* mutants were restored by deleting *phoB*. Also, a polar *pstS* insertion mutation leads to smaller plaque formation in a PhoB-dependent manner in eukaryotic cell (Henle)

monolayers than is seen with the parental *Shigella flexneri* strain (42). On the other hand, the Pst system was reported to affect adherence of EPEC independently of the Pho regulon (17). There are major differences between this study on EPEC and results we obtained with APEC strain χ 7122. An EPEC Δ pstC Δ phoB double mutant still displayed reduced levels of adherence. Further, a Δ phoR(T220N) Pho constitutive EPEC mutant, where the Pst system was functional, adhered to cells as well as the EPEC parent strain. In contrast, our Δ phoR(T220N) mutant of the APEC χ 7122 strain was attenuated, whereas a Δ pstC Δ phoB double mutant regained virulence attributes. Accordingly, in our study, *phoB* is epistatic to *pst* in terms of the Pho constitutive phenotype and attenuation of virulence attributes. Taken together, our results indicate that constitutive activation of the Pho regulon rather than a loss of phosphate transport mediated by the Pst system is predominantly responsible for the attenuation of APEC χ 7122. Similarly, in *Vibrio cholerae*, a recent study demonstrated that the attenuation observed in a *pst* mutant is due to induction of the Pho regulon and not loss of a functional Pst system, using a *pstA*(R454Q) point mutation which allows wild-type expression of genes in the Pho regulon but prevents Pst-mediated phosphate transport (39). In addition, deletion of *phoB*, and hence inactivation of the Pho regulon, did not alter APEC virulence, since the Δ phoB mutant retained virulence and demonstrated virulence phenotypes comparable to those of the wild-type strain. Interestingly, this is in contrast to the case with *V. cholerae*, for which a *phoB* null mutant was less able to colonize adult rabbit ligated ileal loops in a competitive model and in the infant mouse model of cholera (39, 49, 50). These contrasting results between different bacterial pathogens emphasize the various effects that alteration in the regulatory control of the Pho regulon may have on virulence.

The virulence phenotype in APEC χ 7122 is dependent on the activation level of the Pho regulon. We demonstrate for the first time to our knowledge that the degree of attenuation in *E. coli* correlated with increased activity of the Pho regulon. In fact, increases in AP activity (Table 3) correlated with decreased virulence or competitive fitness in chickens and differences in sensitivity to hydrogen peroxide and serum and in yeast agglutination (Fig. 3, Table 4, and Fig. 1 and 2, respectively). The Δ pstCAB mutant was more affected than both the Δ pstC and Δ phoR(T220N) mutants in those assays, and the Pho regulon activation level in the Δ pstCAB mutant was more important than those in both the Δ pstC and Δ phoR(T220N) mutants. The Δ phoR(T220N) mutant is defective in PhoR inhibitory activity (its phosphatase activity) but not in its ability to activate PhoB (7) and is known to have a modest level of constitutive Pho activity (51, 54). The AP activity differences between the Δ pstCAB and Δ pstC mutants could be due to the fact that the Δ pstCAB mutant lacks a functional PstA permease and PstB ATPase in addition to having a loss of the PstC permease. Indeed, it was suggested that PstB is important for inhibition of the Pho regulon by acting in concert with PhoU (52). It is also possible that differences between the Δ pstCAB and Δ pstC strains may be due to loss of an intergenic region 3' of *pstA* in the Δ pstCAB mutant. Recently this region was suggested to stimulate translation of *rpoS* (44), and RpoS, an alternative sigma factor of RNA polymerase, plays a central role in stress response under many stress conditions and modulates the ex-

pression of genes such as those belonging to the Pho regulon (45). Overall, it is likely that a stronger induction of the Pho regulon leads to a higher expression of genes associated directly or indirectly with virulence.

Our results demonstrated that the resistance to serum is impaired when the Pho regulon is constitutively active and that sensitivity to serum is relative to the level of Pho regulon activity (Fig. 1). This is significant since there is a correlation between resistance to the bactericidal effects of serum and the capacity of APEC strains to cause septicemia and mortality (29, 35). Resistance to the bactericidal effect of complement is a multifactorial phenomenon. It is recognized that resistance to serum can correlate with the expression of specific capsular K antigens in combination with O polysaccharides (19, 37, 53). In fact, an O78-negative LPS mutant of strain χ 7122 became serum sensitive and was unable to persist in body fluids and internal organs of infected chickens (35). Our previous work also reported that the Pho regulon is involved in modifications of lipid A, since a major decrease (66%) in the 1-pyrophosphate lipid A species is observed in *pst* mutants (27). Perhaps the Pho regulon may participate in the increased sensitivity of mutants to the bactericidal effects of serum by contributing to bacterial surface perturbations (26).

A decrease in the production of type 1 fimbriae also correlated with the level of activation of the Pho regulon (Fig. 2). Our previous work has also shown that genes involved in type 1 fimbrial biosynthesis were downregulated in a χ 7122 APEC *pst* mutant (10). Additionally, type 1 fimbriae are expressed in the primary site of initial respiratory infection, namely, the air sacs of poultry (15, 38). Therefore, a decreased production of type 1 fimbriae in Pho-activated mutants may contribute to reduced APEC colonization and virulence.

Sensitivity to oxidative stress following exposure to hydrogen peroxide also correlated with increased levels of constitutive AP activity. However, no notable difference was observed between the different mutants where the Pho regulon is activated. This was probably due to the low sensitivity of the technique (Table 4). The ability to resist reactive oxygen species (ROS) is crucial for full virulence when pathogens face oxidative stress during infection of the host (10, 22). Differential expression data for genes involved in oxidative stress observed in a *Pst* mutant indicated that the mutant is subjected to increased oxidative stress during growth and is likely less able to cope with additional stresses incurred from exogenous ROI-generating compounds (10, 46).

Constitutive Pho activity results in reduced virulence in chickens. By using an avian experimental coinfection model, we demonstrated that activation of the Pho regulon of χ 7122 leads to attenuation of virulence, since the Δ *pstCAB*, Δ *pstC*, and *phoR(T220N)* mutants were all outcompeted in the chicken by the wild-type strain (Fig. 3). These results indicate that during systemic infection, the Pho constitutive phenotype represents a selective disadvantage in regard to immune defenses, nutritional limitations, and other environmental stresses encountered within the host.

Taken together, our results confirm that the PhoB-mediated constitutive activity of the Pho regulon plays a major role in attenuation of APEC χ 7122 virulence and associated traits. In contrast, the P_i transport function of the *Pst* system was shown to play a limited role in virulence since the *Pst* system is not

expressed in a virulent PhoB mutant and the *Pst* system is also fully functional in the *phoR(T220N)* attenuated mutant, which demonstrated increased constitutive activity of the Pho regulon. Results also further emphasize the fact that PhoB has a dual function as a response regulator for phosphate homeostasis and as a modulator of virulence attributes. There is a clear need for novel approaches to prevent and control bacterial infections, including avian colibacillosis. Suitable attenuated vaccines should be sufficiently invasive and persistent to induce protective immunity and minimize susceptibility to natural infection (18). Interestingly, since the degree of attenuation in the APEC mutants described herein varied according to the degree of constitutive activation of the Pho regulon, this could be useful in the design of new attenuated vaccine strains.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sébastien Crépin (INRS-IAF) for technical aid during infection experiments. Also, we are grateful to Martin Lamarche (INRS-IAF) for technical advice and to Michaël Mourez for helpful discussions during this study.

Nicolas Bertrand was supported by FQRNT and by CRIP (FORNT Regroupements stratégiques 111946). This work was supported by grants to Josée Harel (NSERC RGPIN-25120) and to Charles M. Dozois (NSERC RGPIN 250129-07 and a Canada Research Chair).

REFERENCES

- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2:2006.0008.
- Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll. 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10:701–713.
- Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier. 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 70:6032–6042.
- Brickman, E., and J. Beckwith. 1975. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phl80 transducing phages. *J. Mol. Biol.* 96:307–316.
- Buckles, E. L., X. Wang, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, and M. S. Donnenberg. 2006. *PhoU* enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* 152:153–160.
- Burall, L. S., J. M. Harro, X. Li, C. V. Lockatell, S. D. Himpel, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley. 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect. Immun.* 72:2922–2938.
- Carmany, D. O., K. Hollingsworth, and W. R. McCleary. 2003. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J. Bacteriol.* 185:1112–1115.
- Cheng, C., S. M. Tennant, K. I. Azzopardi, V. Bennett-Wood, E. L. Hartland, R. M. Robins-Browne, and M. Tauschek. 2009. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 77:1936–1944.
- Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9–14.
- Crépin, S., M. G. Lamarche, P. Garneau, J. Seguin, J. Proulx, C. M. Dozois, and J. Harel. 2008. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics* 9:568.
- Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel. 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* 63:4924–4927.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6640–6645.
- Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299–316.
- Dieye, Y., K. Ameiss, M. Mellata, and R. Curtiss III. 2009. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* 9:3.
- Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother. 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1

- (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis. 38:231–239.
16. Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Appl. Environ. Microbiol. 75:184–192.
 17. Ferreira, G. M., and B. Spira. 2008. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. Microbiology 154:2025–2036.
 18. Frey, J. 2007. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. Vaccine 25:5598–5605.
 19. Goldman, R. C., K. Joiner, and L. Leive. 1984. Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. J. Bacteriol. 159:877–882.
 20. Jacobsen, S. M., M. C. Lane, J. M. Harro, M. E. Shirliff, and H. L. Mobley. 2008. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52:180–193.
 21. Jans, D. A., A. L. Fimmel, L. Langman, L. B. James, J. A. Downie, A. E. Senior, G. R. Ash, F. Gibson, and G. B. Cox. 1983. Mutations in the *uncE* gene affecting assembly of the c-subunit of the adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. Biochem. J. 211:717–726.
 22. Johnson, J. R., C. Clabots, and H. Rosen. 2006. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect. Immun. 74:461–468.
 23. Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard, and L. K. Nolan. 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 74:7043–7050.
 24. Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss III, and P. Sundaram. 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. Infect. Immun. 66:5599–5606.
 25. Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. Gene 109:137–141.
 26. Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss III, J. D. Dubreuil, and J. Harel. 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. Infect. Immun. 73:4138–4145.
 27. Lamarche, M. G., S. H. Kim, S. Crepin, M. Mourez, N. Bertrand, R. E. Bishop, J. D. Dubreuil, and J. Harel. 2008. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. J. Bacteriol. 190:5256–5264.
 28. Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crepin, and J. Harel. 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. FEMS Microbiol. Rev. 32:461–473.
 29. La Ragione, R. M., and M. J. Woodward. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. Res. Vet. Sci. 73:27–35.
 30. Lymberopoulos, M. H., S. Houle, F. Daigle, S. Leveille, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, J. R. Johnson, and C. M. Dozois. 2006. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. J. Bacteriol. 188:6449–6459.
 31. Makino, K., M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, and M. Suzuki. 1996. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. J. Mol. Biol. 259:15–26.
 32. Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata. 1986. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 190:37–44.
 33. Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata. 1986. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 192:549–556.
 34. Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol. 174:1–7.
 35. Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother. 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect. Immun. 71:536–540.
 36. Mitrophanov, A. Y., and E. A. Groisman. 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. Genes Dev. 22:2601–2611.
 37. Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother. 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K “V165” F165 and evaluation of its role in pathogenicity. Infect. Immun. 60:5048–5056.
 38. Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother. 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 22:331–341.
 39. Pratt, J. T., A. M. Ismail, and A. Camilli. 2010. PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 77:1595–1605.
 40. Provenge, D. L., and R. Curtiss III. 1992. Role of *crf* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crf* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. Infect. Immun. 60:4460–4467.
 41. Rao, N. N., and A. Torriani. 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 4:1083–1090.
 42. Runyen-Janecky, L. J., A. M. Boyle, A. Kizze, L. Liefer, and S. M. Payne. 2005. Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. Infect. Immun. 73:1404–1410.
 43. Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss III, and C. M. Dozois. 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. Infect. Immun. 76:601–611.
 44. Schurdell, M. S., G. M. Woodbury, and W. R. McCleary. 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *spoS* translation during phosphate limitation. J. Bacteriol. 189:1150–1153.
 45. Spira, B., and T. Ferenci. 2008. Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and *spoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. Arch. Microbiol. 189:43–47.
 46. Storz, G., and J. A. Imlay. 1999. Oxidative stress. Curr. Opin. Microbiol. 2:188–194.
 47. Surin, B. P., H. Rosenberg, and G. B. Cox. 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. J. Bacteriol. 161:189–198.
 48. Taylor, P. W., and H. P. Kroll. 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. Infect. Immun. 39:122–131.
 49. von Kruger, W. M., S. Humphreys, and J. M. Ketley. 1999. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. Microbiology 145:2463–2475.
 50. von Kruger, W. M., L. M. Lery, M. R. Soares, F. S. de Neves-Manta, C. M. Batista e Silva, A. G. Neves-Ferreira, J. Perales, and P. M. Bisch. 2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. Proteomics 6:1495–1511.
 51. Wanner, B. L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, p. 1357–1381. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
 52. Wanner, B. L. 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104–128. In S. Silver and W. Walden (ed.), Metal ions in gene regulation. Springer, New York, NY.
 53. Whitfield, C., and I. S. Roberts. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 31:1307–1319.
 54. Yamada, M., K. Makino, M. Amemura, H. Shinagawa, and A. Nakata. 1989. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. J. Bacteriol. 171:5601–5606.

Editor: A. Camilli

3. Annexe 3: The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*

En tant que le troisième auteur de cet article de revue, j'ai contribué à la rédaction de plusieurs paragraphes concernant le régulon Pho et la pathogénèse des EHEC. J'ai également apporté mes commentaires sur l'ensemble de la revue avant soumission.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Review

The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*

Sébastien Crépin^{a,b}, Samuel-Mohammed Chekabab^{b,c,1}, Guillaume Le Bihan^{b,c,1},
Nicolas Bertrand^c, Charles M. Dozois^{a,b,c}, Josée Harel^{b,c,*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

^b Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

^c Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2010
Received in revised form 18 May 2011
Accepted 25 May 2011

Keywords:

Pho regulon
Pathogenic *Escherichia coli*
Two-component regulatory system
Stress response

ABSTRACT

During the course of infection, bacteria must coordinately regulate gene expression in response to environmental stimuli. The phosphate (Pho) regulon is controlled by the two component-regulatory system PhoBR. PhoBR is activated during starvation and regulates genes involved in phosphate homeostasis. Several studies have highlighted the importance of the Pho regulon in bacterial pathogenesis, showing how induction of PhoBR, in addition to regulating genes participating in phosphate metabolism, leads to modulation of many cellular processes. The pleiotropic effects of Pho regulon activation include attenuated virulence and alteration of many virulence traits, including adhesion to host cells and resistance to cationic antimicrobial peptides, acidity and oxidative stresses. This review provides an overview of the relationship between the Pho regulon and virulence in *Escherichia coli* and illustrates that, in addition to regulating phosphate homeostasis, the Pho regulon plays a key role in regulating stress responses and virulence.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	83
2. Induction of the Pho regulon.	83
3. Pho regulon activation and ExPEC virulence	85
4. Dissecting the specific contribution of both PhoBR and Pst systems	85
5. Oxidative stress response	85
6. Bacterial cell surface modification	85
7. Adhesin production and adherence	86
8. Intestinal pathogenic <i>E. coli</i>	86
9. Pst system and adhesion of intestinal pathogenic <i>E. coli</i> strains.	86
10. Activation of the Pho regulon during adaptation by EHEC to environment	86
11. EHEC virulence factors regulated by PhoBR	86
12. Concluding remarks.	87
Acknowledgements	87
References	87

* Corresponding author at: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Tel.: +1 450 773 8521x8233; fax: +1 450 778 8108.

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

To adapt and survive in different microenvironments, bacteria must sense and respond to extracellular signals. The adaptive response to environmental stimuli can be transduced by two-component regulatory systems (Gao and Stock, 2009), which are involved in the regulation of chemotaxis, osmoregulation, metabolism and transport (Mizuno, 1997). A typical two-component regulatory system (TCRS) is composed of an inner-membrane histidine kinase (HK) sensor protein and a response regulator (RR) that acts as a DNA-binding protein, activating or repressing gene expression (West and Stock, 2001).

Phosphorus, in terms of cellular content, is the third most abundant element. It is found in several molecules, including membrane lipids, complex sugars and nucleic acids. Phosphate is also involved in energy metabolism and in signal transduction, which is mediated by a TCRS (Wanner, 1996). The extracellular concentration of phosphate is sensed by the two-component regulatory system PhoBR, in which PhoR encodes the HK and PhoB the RR. PhoBR responds to phosphate limitation, when the extracellular phosphate concentration falls below $4 \mu\text{M}$. In phosphate-limiting conditions, PhoBR induces genes belonging to the Pho (phosphate) regulon, which includes genes involved in acquisition and metabolism of different phosphate groups (Hsieh and Wanner, 2010; Lamarche et al., 2008b; Wanner, 1996). The control of the Pho regulon and transmembrane signal transduction by environmental inorganic phosphate (P_i) has been extensively studied in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In *E. coli* K-12, the Pho regulon comprises 31 genes (Hsieh and Wanner, 2010) and, in addition to being involved in

phosphate homeostasis, is also connected to bacterial virulence as its induction results in attenuated pathogens.

Host–pathogen interactions are dynamic processes responding to the diverse environmental conditions encountered by invading pathogens. Survival of a pathogen in different sites in the host requires an adaptive response capable of reacting to different stimuli in its immediate environment. The specialised regulatory systems that control the expression of virulence factors are essential for survival and necessarily complex, with interconnections between regulatory systems at many levels. Although the presence of pathogen-specific genes may dictate the pathogenic lifestyle and virulence potential of pathogenic *E. coli*, products encoded by conserved or “core” genes undoubtedly contribute to functional metabolism, physiology and adaptation to environmental changes, including host environments and resistance to host defences.

Lamarche et al. (2008b) reviewed the relationship between the Pho regulon, metabolism and pathogenicity. Here, we present a review specifically focusing on the effects on virulence of *Escherichia coli* by the induction of the Pho regulon. First, we briefly overview the induction of the Pho regulon, then discuss the different virulence attributes affected by the induction of the Pho regulon of pathogenic *E. coli*, including resistance to oxidative stress, membrane perturbation, production of adhesins and adaptation to environmental stimuli.

2. Induction of the Pho regulon

As mentioned above, phosphate starvation is sensed by the TCRS PhoBR. PhoBR is activated when the extracellular phosphate concentration falls below $4 \mu\text{M}$, inducing transcription of genes belonging to the Pho regulon. This

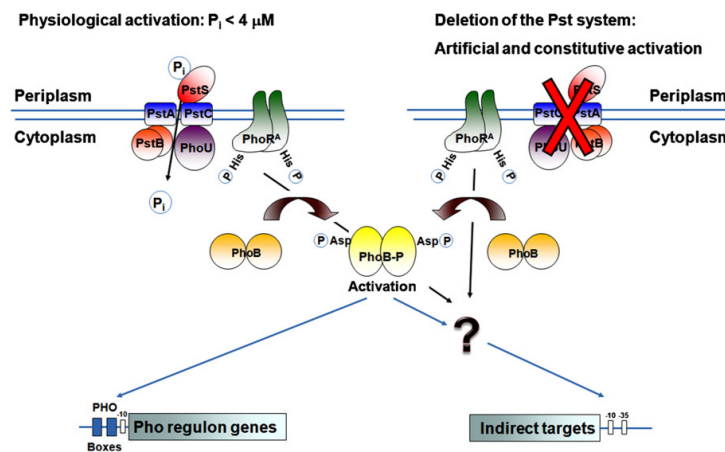


Fig. 1. Induction of the Pho regulon by phosphate starvation and inactivation of the Pst system. Adapted from Lamarche et al. (2008b), with kind permission of John Wiley and Sons. Under phosphate starvation, PhoR autophosphorylates a histidine residue. The phosphoryl group is then transferred onto an aspartate residue of PhoB. This phosphotransfer activates PhoB, which can then bind to Pho boxes and activate transcription of Pho-regulated genes. PhoB or PhoR can also act indirectly on gene expression by regulating other regulators. Furthermore, mutations in any of the genes of the *pst* operon result in constitutive expression of the Pho regulon, regardless of environmental phosphate availability. Abbreviations: P_i , inorganic phosphate; PstS, periplasmic P_i -binding protein; PstA et PstC, integral membrane channel proteins; PstB, ATP-binding protein; PhoU, regulatory protein; PhoB, RR; PhoR, sensor protein (A, autophosphorylated; P, phosphorylated).

is enabled by the binding of phosphorylated PhoB to specific DNA sequences, known as Pho boxes, located within Pho-dependent promoter regions. PhoB binding either induces or represses transcription of genes that comprise the Pho regulon, including those involved in phosphate transport and metabolism (Hsieh and Wanner, 2010; Wanner, 1996) (Fig. 1). One of these systems, the *pstSCAB-phoU* operon, encodes the phosphate-specific transport (Pst) system. The Pst system encodes an ATP-binding cassette (ABC) transporter involved in the transport of inorganic phosphate (P_i). In addition to acting as a phosphate transporter, the Pst system is required for P_i signal transduction, as mutations in any of the genes of the *pst* operon result in constitutive expression of the Pho regulon, regardless of environmental phosphate availability (Hsieh and Wanner, 2010; Lamarche et al., 2008b; Wanner, 1996) (Fig. 1).

In addition to regulating genes involved in phosphate acquisition and metabolism, induction of the Pho regulon seems to have pleiotropic effects, as proteomic analysis of *E. coli* K-12 cultured under phosphate-limiting conditions reveals that up to 400 proteins are differentially expressed (VanBogelen et al., 1996). Microarray experiments performed on K-12 and pathogenic *E. coli* connected the Pho regulon directly or indirectly with multiple metabolic systems (Baek and Lee, 2006, 2007; Crepin et al., 2008; Taschner et al., 2004) (Table 1). Notably, the Pho regulon and bacterial virulence are connected, as its induction regulates pathogen-specific genes, and affects survival and virulence of many bacterial pathogens (Bertrand et al., 2010; Cheng et al., 2009; Crepin et al., 2008; Ferreira and Spira, 2008; Jacobsen et al., 2008; Lamarche et al., 2005, 2008b; Pratt et al., 2010; Yuan et al., 2006). Multiple stress responses and virulence attributes are affected by inactivation of the Pst

Table 1
Attributes affected by the induction of the Pho regulon.

Strains	Virulence	Condition ^a	Altered systems	Phenotype	References
<i>K-12</i>					
MG1655	NA ^b		Oxidative stress	Sensitive	Moreau (2007), Moreau et al. (2001)
W3110	NA		Acid stress	Sensitive	Moreau (2007)
ANCK10	NA		Acid stress	NA	Baek and Lee (2006, 2007)
			Acid stress	NA	Suziedeliene et al. (1999)
<i>ExPEC</i>					
ExPEC 5131	Attenuated		Cell surface modification	Serum and CAMPs ^c sensitive	Daigle et al. (1995), Lamarche and Harel (2010), Lamarche et al. (2008a)
APEC χ 7122	Attenuated		Oxidative stress	Sensitive	Bertrand et al. (2010), Crepin et al. (2008)
			Acid stress	Sensitive	Lamarche et al. (2005)
			Type 1 and F9 fimbriae	Afimbriate	Bertrand et al. (2010), Crepin et al. (2008)
			Cell surface modification	Serum and CAMPs ^c sensitive	Bertrand et al. (2010), Lamarche et al. (2005, 2008a)
CFT073	Attenuated		Type 1 fimbriae production	Reduced mouse bladder colonization	Crépin et al. (manuscript in preparation)
<i>EPEC</i>					
LRT9	NA		Adhesin production	Impaired adhesion onto HEp-2 cells	Ferreira and Spira (2008)
86-1390	NA		?	Impaired attachment onto piglet ileal explants	Batissou et al. (2003)
E128012	NA		Adhesin production	Impaired attachment onto HEp-2 cells	Cheng et al. (2009)
<i>C. rodentium</i> ICC169	Attenuated			Impaired colonization of intestine	Cheng et al. (2009)
<i>EHEC</i>					
EDL933	NA	Exposure to sodium benzoate	Pst system; PhoBR		Critzer et al. (2010)
TW14359	NA	Exposure to oxidative stress	Pst system		Wang et al. (2009)
Sakai	NA	Exposure to oxidative stress	Pst system; PhoBR; PhoA		Wang et al. (2009)
			Putative RTX-toxin protein; Cognate type I secretion system		Yoshida et al. (2010)
FDA518	NA	Acid stress	PhoB		Allen et al. (2008)
Isolated from previously diagnosed HUS ^d patient	NA	Exposure to convalescent sera	PhoE; PhoA		John et al. (2005)

^a Condition under which the Pho regulon is induced.

^b Not applicable.

^c CAMPs, cationic antimicrobial peptides.

^d HUS, haemolytic and uraemic syndrome.

system. Specifically, general, oxidative and acid stress responses are connected with the Pho regulon. The connection between the general and acid stress responses has consequences for the virulence of pathogenic *E. coli* (Lamarche et al., 2008b; Crepin et al., 2008). Among the virulence attributes altered by induction of the Pho regulon are a significant reduction in the amount of capsular antigen at the cell surface, resistance to the bactericidal effect of serum, to cationic antimicrobial peptides, and to acid and oxidative stresses, as well as the production of type 1 fimbriae (Bertrand et al., 2010; Crepin et al., 2008; Daigle et al., 1995; Lamarche et al., 2005, 2008a; Lamarche and Harel, 2010; Ngeleka et al., 1992).

3. Pho regulon activation and ExPEC virulence

Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) are an important group of pathogenic *E. coli* that cause a diversity of infections in both humans and animals, including urinary tract infections (UTIs), meningitis, and septicemia (Dobrindt and Hacker, 2008; Belanger et al., 2011).

The role of the Pho regulon in virulence of ExPEC has been principally studied in the ExPEC strain 5131, which causes septicemia in pigs, and the avian pathogenic *E. coli* (APEC) O78 strain χ 7122, which causes colibacillosis in poultry (Bertrand et al., 2010; Crepin et al., 2008; Daigle et al., 1995; Lamarche et al., 2005, 2008a; Lamarche and Harel, 2010). In APEC strain χ 7122, the level of attenuation of virulence of mutant strains correlated directly with the level of activation of the Pho regulon (Bertrand et al., 2010). However, selective capture of unique transcribed sequences (SCOTS) revealed that *phoB* was expressed during experimental infection of chicken with APEC strain χ 7122 (Dozois et al., 2003), suggesting that fine-tuning of the Pho regulon is required for virulence, while inappropriate or constitutive induction of the Pho regulon has deleterious effects.

4. Dissecting the specific contribution of both PhoBR and Pst systems

As mentioned above, the Pst system contributes to both regulation of the Pho regulon and high-affinity uptake of P_i . Until recently, this dual function for Pst made it difficult to explain the effects of Pst inactivation on the virulence of APEC, as it was unclear whether attenuation was due to constitutive activation of the PhoBR TCRS or the loss of Pst-mediated high-affinity phosphate uptake. However it has been shown that PhoB-mediated constitutive activation of the Pho regulon, rather than inactivation of the Pst system, was critical for the virulence of APEC (Bertrand et al., 2010). A point mutation in *phoR*, which constitutively activated the Pho regulon independently of P_i transport and inactivated the *pst* system, attenuated virulence and virulence attributes, such as sensitivity to hydrogen peroxide and serum, and production of type 1 fimbriae (Bertrand et al., 2010). Interestingly, it was determined that the PhoB regulator is not required for virulence in APEC. This is contrast with the implications of SCOTS analysis experiments, but accords with recent work by Pratt et al. (2010) that showed that the attenuation of

virulence of *V. cholerae* in a *pst* mutant was due to induction of the Pho regulon, not P_i transport per se.

5. Oxidative stress response

Oxidative stress is produced by bacterial metabolism (respiration), the immune system and exposure to host environmental factors such as metal ions. Oxidative stress induces damage to DNA, proteins and membranes, and can lead to cell death (Seib et al., 2006). The expression of some genes whose products exhibit antioxidant activities were modulated in an APEC *pst* mutant (Crepin et al., 2008). The catalase *katE*, the superoxide dismutase *sodC*, the DNA protection protein *dps* and the small regulatory RNA *oxyS* were among the differentially expressed genes. However, the *pst* mutants were more sensitive to agents generating reactive oxygen intermediates (ROI) than the parent strain χ 7122 (Bertrand et al., 2010; Crepin et al., 2008). In *E. coli* K-12, it was observed that the alkylhydroperoxide reductase *ahpCF*, the catalase *katG* and the pyruvate oxidase *poxB* genes are required to resist oxidative stress generated by glucose metabolism (Moreau, 2007; Moreau et al., 2001). Since the ability to resist oxidative stress is crucial for full virulence in ExPEC (Johnson et al., 2006), the sensitivity of *pst* mutants to oxidative stress could explain, at least in part, their attenuation.

6. Bacterial cell surface modification

Under conditions of phosphate starvation, bacteria have been shown to modify their phospholipids by substituting them with phosphorus-free lipids (Lamarche et al., 2008b; Zavaleta-Pastor et al., 2010). A strong influence of the Pst system and the associated Pho regulon in modifications of lipid A structure and cell surface perturbations has been demonstrated in strain χ 7122. Indeed, mutation in the Pst system results in structural modifications of lipid A, including a reduced amount of its hexa-acylated-1-pyrophosphate form (Lamarche et al., 2008a). The outer monolayer of the outer membrane of most gram-negative bacteria is composed of lipopolysaccharides, which includes the lipid A. These are involved in outer membrane integrity, forming a protective barrier against various environmental stresses (Bishop, 2005; Frirdich and Whitfield, 2005; Nikaido, 2003; Nikaido and Vaara, 1985). The change in lipid A structure in *pst* mutants is exemplified by increased sensitivity of the mutant to serum complement, vancomycin and cationic antimicrobial peptides (CAMPs) (Bertrand et al., 2010; Daigle et al., 1995; Lamarche et al., 2005, 2008a).

In addition to being involved in the biosynthesis of lipid A, deletion of the Pst system leads to an imbalance in cyclopropane (CFA) and unsaturated fatty acids (UFA), and increases outer membrane permeability (Lamarche and Harel, 2010). Microarray analysis has also revealed that lipid A modification and the differential expression of genes belonging to the biosynthesis of enterobacterial common antigen and LPS biosynthesis occurred in a *pst* APEC mutant (Crepin et al., 2008; Lamarche et al., 2008a). Since membrane integrity is required for resistance to environmental stresses, membrane perturbation in *pst* mutants may explain the decrease of such virulence traits in pathogenic *E. coli*.

7. Adhesin production and adherence

Type 1 and F9 fimbriae mediate adherence of *E. coli* to host cells and are involved in biofilm formation (Dziva et al., 2004; Nielubowicz and Mobley, 2010; van Diemen et al., 2005). Type 1 fimbriae play a key role in virulence (Bahrani-Mougeot et al., 2002; Connell et al., 1996; Mulvey et al., 1998; Schaeffer et al., 1987; Snyder et al., 2004; Teng et al., 2005). In APEC *pst* mutants, it was observed that expression of these fimbriae was repressed (Bertrand et al., 2010; Crepin et al., 2008), as no fimbriae were found on their surface (Crepin et al., 2008). Since type 1 fimbriae were preferentially expressed in air sacs, the primary site of infection of APEC (Dozois et al., 1994; Pourbakhsh et al., 1997), a decrease in fimbrial production in the *pst* mutant may contribute to reduced APEC colonisation and virulence. Similarly, in uropathogenic *E. coli* (UPEC), inactivation of the *pst* system also repressed expression of type 1 fimbriae and altered virulence (Crépin et al., manuscript in preparation).

8. Intestinal pathogenic *E. coli*

Intestinal pathologies mostly result in more or less severe diarrhoea, in some cases leading to more severe diseases. Among the diseases associated with *E. coli* include enteric infections caused by different pathotypes of diarrhoeagenic *E. coli*, such as enterotoxigenic, enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli* (EPEC, EPEC and EHEC respectively). Diarrhoeagenic EPEC and EHEC produce a characteristic attaching and effacing (A/E) lesion on the brush border of infected intestinal enterocytes that is characterised by localised destruction (effacement) and intimate bacterial attachment (Kaper et al., 2004). These pathotypes pose a significant risk to human and animal health world-wide. As a cause of animal (and zoonotic) disease, attaching and effacing *E. coli* (AEEC) infections have a great impact on human food safety (with animals such as cattle reservoirs of some human pathogenic strains), animal welfare, economic production (costly outbreaks of post-weaning diarrhea in pigs, risk of trade barriers), and environmental biosafety.

9. Pst system and adhesion of intestinal pathogenic *E. coli* strains

In the *in vitro* organ culture (IVOC) model, insertion of a transposon into the *pstS* gene impairs the ability of a porcine EPEC strain to attach to piglet ileal enterocytes (Batisson et al., 2003). Deletion of the *pst* operon in the EPEC strain LRT9 (O111:abH2) impairs its adherence to Hep-2 intestinal cells (Ferreira and Spira, 2008). It has been hypothesised that the reduced adherence was due to the down-regulation of the *bfp* operon and *eae*, which code for the bundle forming pili and the adhesin intimin, respectively. Bfp is involved in the formation of microcolonies and intimin is involved in intimate adherence (Ferreira and Spira, 2008). Their positive regulator genes, *perA* and *perC*, were also repressed (Ferreira and Spira, 2008). Similarly, in the atypical EPEC strain E128012 (O114:H2), which lacks Bfp, adherence of a *pst* mutant to Hep-2 and T84 intestinal cells was reduced (Cheng et al., 2009). A *pst* mutant of the pathogen *Citrobacter*

rodentium, which causes attaching and effacing intestinal lesions in mice, is excreted in lower numbers by C56BL/6 mice (Cheng et al., 2009). It was suggested that the Pho regulon represses uncharacterized adhesins required for virulence (Cheng et al., 2009). Indeed, activation of the Pho regulon (PhoBR) by deletion of the *pst* system represses these adhesins, while adherence to HT-29 intestinal epithelial by EHEC O157:H7 ATCC strain 43894 down-regulates *phoBR* and *pstS* (Kim et al., 2009).

These observations indicate that disruption of the *pst-phoU* locus not only activates the Pho regulon but also induces various effects on adherence. In EPEC and EHEC, an intact Pst system seems to be required for full virulence by facilitating intestinal colonization.

10. Activation of the Pho regulon during adaptation by EHEC to environment

The role of the Pst system (Pho regulon) in the virulence of EHEC has not been well studied. Information about the induction of the Pho regulon by environmental stress mainly emanates from transcriptional studies. Exposure of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 to sodium benzoate, a bacteriostatic and fungistatic agent, led to the up-regulation of *pst* and other genes of the Pho regulon (Critzler et al., 2010). It was suggested that the Pst system could function as an efflux pump for sodium benzoate, as observed for *Mycobacterium smegmatis* (Bhatt et al., 2000). Exposure of *E. coli* O157:H7 strains TW14359 and Sakai to oxidative stress up-regulated transcription of the *pst* operon as well as PhoBR (Wang et al., 2009). Under acid shock conditions, the Pho regulon response regulator *phoB* was induced in EHEC O157:H7 strain FDA518 (Allen et al., 2008). PhoB activates *asr*, a gene encoding an acid shock protein required for survival in moderately acidic conditions in *E. coli* K-12 (Suziedeliene et al., 1999), and to induce other acid shock proteins (Baek and Lee, 2006, 2007; Crepin et al., 2008). Using *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT), PhoE and PhoA, an outer membrane porin involved in the transport of various anions and a periplasmic alkaline phosphatase, respectively, were identified among the *E. coli* O157:H7 proteins reacting with sera from patients previously diagnosed with haemolytic and uraemic syndrome (John et al., 2005). This further indicates that members of the Pho regulon are expressed by pathogenic *E. coli* during infection.

11. EHEC virulence factors regulated by PhoBR

Candidate genes with putative PhoB binding sites were identified in EHEC O157:H7 Sakai as well as strain EDL933 (Yuan et al., 2006). In the Sakai strain, one of these loci was confirmed to be directly regulated by PhoB using a genomic library fused to *lacZ*. Yoshida et al. (2010) have demonstrated that the gene cluster *esc0540-0544* is positively regulated by the Pho regulon. This gene cluster is homologous to the *siICA-DA* operon of *Escherichia fergusonii*, which encodes a putative RTX toxin and its cognate type I secretion system (TISS) (Yoshida et al., 2010). Although the function of this putative RTX toxin in *E. coli* O157:H7 has not yet been established, it was suggested that P_i sensing could regulate such a secretion system in EHEC.

12. Concluding remarks

Pathogenic *E. coli* must survive in nutritionally disparate environments, including some ecosystems where P_i can be limited (Pratt et al., 2010). The Pho regulon is required for survival, not only to control phosphate homeostasis, but also to take part in a complex network important for both bacterial virulence and stress responses. Inappropriate expression or repression of this system may have significant consequences on bacterial virulence. Mutations in the Pst system or PhoB result in multiple effects, including alteration of *E. coli* virulence traits. Although these effects may be due to a deficiency in phosphate uptake under some conditions, PhoBR TCRS regulation is likely to be responsible for the multiple effects that are observed in Pst and PhoB *E. coli* mutants. PhoB-mediated constitutive activity of the Pho regulon plays a major role in attenuation of virulence and associated traits in these mutants. Changes in adhesion expression, as well as altered capacity to adhere to cells and tissues, are affected by the activation of the Pho regulon. More in depth investigation needs to be done to characterize the functions associated with virulence genes of *E. coli* that are under the control of the Pho regulon.

Every year, the poultry industry sustains significant financial losses due to the high morbidity and mortality caused by APEC. Some ExPEC strains are capable of infecting both poultry and mammals, suggesting the zoonotic potential of certain APEC strains (Barnes et al., 2003; Belanger et al., 2011; Ron, 2006). EPEC and EHEC infections have an impact on human food safety, animal welfare, economic production and environmental biosafety. With antimicrobial resistance of bacterial pathogens on the increase, it is important to develop novel preventive and therapeutic strategies. Designers of new attenuated vaccine strains may be able to take advantage of the fact that the degree of attenuation in *pst* and *phoBR* mutants can vary with the degree of constitutive activation of the Pho regulon (Bertrand et al., 2010). Drugs inducing the Pst system or directly affecting PhoBR activity may also be useful as therapeutic agents to compromise bacterial virulence and facilitate elimination of the pathogen by host defences (Cegelski et al., 2008, 2009; Chauhan and Calderone, 2008; Garrity-Ryan et al., 2010; Mattmann and Blackwell, 2010; Rasko et al., 2008).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Kaarla Sundstrom for her revisions of the manuscript. We also gratefully acknowledge the financial help of Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to J.H. (RGPIN-25120) and C.M.D. (RGPIN 250129-07), studentships from Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) (S.C. and N.B.), Fondation Armand-Frappier (S.C.), Institut de Recherche en Santé Publique de l'Université de

Montréal (G.L.) and CRIP (FQRNT Regroupements stratégiques 111946) (N.B. and S.M.C.).

References

- Allen, K.J., Lepp, D., McKellar, R.C., Griffiths, M.W., 2008. Examination of stress and virulence gene expression in *Escherichia coli* O157:H7 using targeted microarray analysis. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 437–447.
- Baek, J.H., Lee, S.Y., 2006. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 264, 104–109.
- Baek, J.H., Lee, S.Y., 2007. Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 244–252.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M., Donnenberg, M.S., 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* 45, 1079–1093.
- Barnes, H.J., Vaillancourt, J.-P., Gross, W.B., 2003. Colibacillosis. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swaine, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 631–652.
- Batisson, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel, J., 2003. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 4516–4525.
- Belanger, L., Gareniaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C.M., 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 1–10.
- Bertrand, N., Houle, S., Lebihan, G., Poirier, E., Dozois, C.M., Harel, J., 2010. Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect. Immun.* 78, 5324–5331.
- Bhatt, K., Banerjee, S.K., Chakraborti, P.K., 2000. Evidence that phosphate specific transporter is amplified in a fluorquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Eur. J. Biochem. – FEBS* 267, 4028–4032.
- Bishop, R.E., 2005. Fundamentals of endotoxin structure and function. *Contrib. Microbiol.* 12, 1–27.
- Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R., Hultgren, S.J., 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 17–27.
- Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Aberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman, M.R., Hultgren, S.J., 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat. Chem. Biol.* 5, 913–919.
- Chauhan, N., Calderone, R., 2008. Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi. *Infect. Immun.* 76, 4795–4803.
- Cheng, C., Tennant, S.M., Azzopardi, K.I., Bennett-Wood, V., Hartland, E.L., Robins-Browne, R.M., Tauschek, M., 2009. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 77, 1936–1944.
- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S., Svanborg, C., 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9827–9832.
- Crépin, S., Lamarche, M.G., Garneau, P., Seguin, J., Proulx, J., Dozois, C.M., Harel, J., 2008. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics* 9, 568.
- Critzler, F.J., D'Souza, D.H., Saxton, A.M., Golden, D.A., 2010. Increased transcription of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to sodium benzoate. *J. Food Prot.* 73, 819–824.
- Daigle, F., Fairbrother, J.M., Harel, J., 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* 63, 4924–4927.
- Dobrindt, U., Hacker, J., 2008. Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 409–413.
- Dozois, C.M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., Fairbrother, J.M., 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 38, 231–239.
- Dozois, C.M., Daigle, F., Curtiss 3rd, R., 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 247–252.

- Dziva, F., van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Smith, A.J., Wallis, T.S., 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 150, 3631–3645.
- Ferreira, G.M., Spira, B., 2008. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiology* 154, 2025–2036.
- Firidich, E., Whitfield, C., 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J. Endotoxin Res.* 11, 133–144.
- Gao, R., Stock, A.M., 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 133–154.
- Garrity-Ryan, L.K., Kim, O.K., Balada-Llasat, J.M., Bartlett, V.J., Verma, A.K., Fisher, M.L., Castillo, C., Songsunthong, W., Tanaka, S.K., Levy, S.B., Mccas, J., Aleksun, M.N., 2010. Small molecule inhibitors of LcrF, a *Yersinia pseudotuberculosis* transcription factor, attenuate virulence and limit infection in a murine pneumonia model. *Infect. Immun.* 78, 4683–4690.
- Hsieh, Y.J., Wanner, B.L., 2010. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 198–203.
- Jacobsen, S.M., Lane, M.C., Harro, J.M., Shirliff, M.E., Mobley, H.L., 2008. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 180–193.
- John, M., Kudva, I.T., Griffin, R.W., Dodson, A.W., McManus, B., Krastins, B., Sarracino, D., Progulsk-Fox, A., Hillman, J.D., Handfield, M., Tarr, P.I., Calderwood, S.B., 2005. Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infect. Immun.* 73, 2665–2679.
- Johnson, J.R., Clabots, C., Rosen, H., 2006. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 74, 461–468.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kim, Y., Oh, S., Park, S., Kim, S.H., 2009. Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cells after bacterial attachment. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 224–232.
- Lamarche, M.G., Harel, J., 2010. Membrane homeostasis requires intact *pst* in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 60, 356–359.
- Lamarche, M.G., Dozois, C.M., Daigle, F., Caza, M., Curtiss 3rd, R., Dubreuil, J.D., Harel, J., 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect. Immun.* 73, 4138–4145.
- Lamarche, M.G., Kim, S.H., Crépin, S., Mourez, M., Bertrand, N., Bishop, R.E., Dubreuil, J.D., Harel, J., 2008a. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. *J. Bacteriol.* 190, 5256–5264.
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crépin, S., Harel, J., 2008b. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 461–473.
- Mattmann, M.E., Blackwell, H.E., 2010. Small molecules that modulate quorum sensing and control virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Org. Chem.* 75, 6737–6746.
- Mizuno, T., 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4, 161–168.
- Moreau, P.L., 2007. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J. Bacteriol.* 189, 2249–2261.
- Moreau, P.L., Gerard, F., Lutz, N.W., Cozzone, P., 2001. Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 39, 1048–1060.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., Hultgren, S.J., 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494–1497.
- Ngeleka, M., Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K “V165”:F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.* 60, 5048–5056.
- Nielubowicz, G.R., Mobley, H.L., 2010. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 7, 430–441.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
- Nikaido, H., Vaara, M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49, 1–32.
- Pourbakhsh, S.A., Boulianne, M., Martineau-Doize, B., Dozois, C.M., Desautels, C., Fairbrother, J.M., 1997. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis.* 41, 221–233.
- Pratt, J.T., Ismail, A.M., Camilli, A., 2010. PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 77, 1595–1605.
- Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li de, R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R., Sperandio, V., 2008. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 321, 1078–1080.
- Ron, E.Z., 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 28–32.
- Schaeffer, A.J., Schwan, W.R., Hultgren, S.J., Duncan, J.L., 1987. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. *Infect. Immun.* 55, 373–380.
- Seib, K.L., Wu, H.J., Kidd, S.P., Apicella, M.A., Jennings, M.P., McEwan, A.G., 2006. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 344–361.
- Snyder, J.A., Haugen, B.J., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Donnenberg, M.S., Welch, R.A., Mobley, H.L., 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72, 6373–6381.
- Suziedeliene, E., Suziedelis, K., Garbenciute, V., Normark, S., 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J. Bacteriol.* 181, 2084–2093.
- Taschner, N.P., Yagil, E., Spira, B., 2004. A differential effect of σ^S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 2985–2992.
- Teng, C.H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K.J., Khan, N.A., Di Cello, F., Kim, K.S., 2005. *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular endothelial cells via type 1 fimbriae bacteria in the fimbriated state. *Infect. Immun.* 73, 2923–2931.
- VanBogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L., Neidhardt, F.C., 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 4344–4366.
- van Diemen, P.M., Dziva, F., Stevens, M.P., Wallis, T.S., 2005. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H-genes required for intestinal colonization in calves. *Infect. Immun.* 73, 1735–1743.
- Wang, S., Deng, K., Zaremba, S., Deng, X., Lin, C., Wang, Q., Tortorello, M.L., Zhang, W., 2009. Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6110–6123.
- Wanner, B.L., 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: Neidhardt, R.C.I., Ingraham, J.L., Lin, E.E.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbrager, H.E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 1357–1381.
- West, A.H., Stock, A.M., 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 369–376.
- Yoshida, Y., Sugiyama, S., Oyamada, T., Yokoyama, K., Makino, K., 2010. Identification and characterization of novel phosphate regulon genes, *ecs0540-ecs0544*, in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Genet. Gen.* 284, 197–205.
- Yuan, Z.C., Zaheer, R., Morton, R., Finan, T.M., 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 34, 2686–2697.
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R., Lopez-Lara, I.M., Geiger, O., 2010. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 302–307.