

Université de Montréal

Implication des gènes curli dans un phénotype distinct d'autoagrégation et de formation de biofilm chez certaines souches *Escherichia coli* O157: H7

Par

Yaindrys Rodriguez Olivera

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie**

Décembre 2019

© Yaindrys Rodriguez Olivera, 2019

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé(e)

Implication des gènes curli dans un phénotype distinct d'autoagrégation et de formation de biofilm chez certaines souches *Escherichia coli* O157: H7

Présenté par

Yaindrys Rodriguez Olivera

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

France Daigle

Présidente-rapporteuse

Josée Harel

Directrice de recherche

John Morris Fairbrother

Membre du jury

Résumé

Les bactéries pathogènes *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) O157:H7 causent des toxi-infections sévères chez l'humain. Les biofilms des EHEC rendent difficile leur contrôle dans les environnements favorisant leur persistance. Certaines souches O157:H7 dont celle de référence Sakai, possèdent une capacité accrue à s'autoagréger et former des biofilms. L'étude a visé à identifier les gènes impliqués dans l'autoagrégation et la formation de biofilm chez la souche Sakai, et vérifier l'association des facteurs identifiés avec d'autres EHEC O157:H7 du même phénotype. Avec une banque de mutants Tn10 de la souche Sakai, des mutants non-autoagglutinants et non-formateurs de biofilms des gènes *csgB* et *csgG* furent sélectionnés et caractérisés. Ces mutants formaient significativement moins de biofilms et d'autoagrégats que Sakai, et ne produisaient plus curli. La complémentation des mutants restaurait le phénotype sauvage. De plus, des gènes responsables de la biogenèse de curli *csgA*, *csgB* et *csgG* étaient significativement surexprimés chez Sakai, comparativement avec la souche EDL933 non-autoagglutinant, qui forme moins de biofilm. Parmi les souches d'*E. coli* O157:H7 on distingue deux groupes d'isolats: Sakai-like et EDL933-like selon leur production de curli, et leur capacité à former des autoagrégats et biofilms. Nos résultats suggèrent qu'une surproduction de fibres de curli dans un sous-ensemble de souches O157:H7 pourrait être responsable de leur phénotype particulier d'autoagrégation et de formation de biofilms forts. Le projet permet de mieux cerner le mécanisme de formation de biofilm dans EHEC et renforce l'hypothèse que le curli est une cible intéressante pour contrer la persistance des EHEC en environnements naturels et industriels.

Mots-clés: *Escherichia coli* O157:H7, EHEC, autoagrégation, biofilms, curli.

Abstract

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 is an important foodborne pathogen that causes severe toxin-infections in humans. These bacteria have a higher capacity to form biofilm, impeding the control of the contamination in different environments and allowing their persistence. Some *E. coli* O157:H7 strains, including the Sakai reference strain, display a distinctive ability to autoaggregate and form strong biofilms. The aim of this work was to identify the genes involved in autoaggregation and biofilm formation in Sakai strain, and to verify the association between identified factors and the same phenotype in other EHEC O157: H7. We found that *csgA*, *csgB* and *csgG* curli genes were significantly overexpressed in strain Sakai compared to strain EDL933, a low biofilm-former and non-autoagglutinating strain. Sakai *csgB* and *csgG* Tn10 mutants formed significantly less biofilm and autoaggregation than the wild-type strain, and lost the curli-producing phenotype. Complementation restored the strong autoaggregation and biofilm formation phenotype, and the curled morphology of Sakai. In addition, *E. coli* O157: H7 isolates tested for curli formation, Sakai-like strains were curli-producing, whereas EDL933-like strains were non-curliated. These results suggest that overproduction of extracellular curli fibers in a subset of *E. coli* O157: H7 strains may be responsible for their particular phenotype of autoaggregation and strong biofilm formation. The project provides a better understanding of the mechanism of biofilm formation in EHEC, as well as reinforcing the hypothesis that curli fibers are an attractive target to counter the persistence of these bacteria in natural and industrial environments.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, EHEC, autoaggregation, biofilm formation, curli fibers.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations	16
Remerciements	20
INTRODUCTION	23
REVUE DE LA LITTÉRATURE	27
I- Les <i>Escherichia coli</i>	28
1.1 Généralités des <i>Escherichia coli</i>	28
1.2 Les <i>E. coli</i> pathogènes	28
1.2.1 Les <i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	30
1.2.2 Les <i>E. coli</i> entéroagréгатives (EAEC)	31
1.2.3 Les <i>E. coli</i> enteroinvasives (EIEC).....	31
1.2.4 Les <i>E. coli</i> adhérentes de manière diffuse (DAEC)	31
1.2.5 Les <i>E. coli</i> adhérentes et invasives (AIEC)	32
1.2.6 Les <i>E. coli</i> entéropathogéniques (EPEC).....	32
1.3 Les <i>Escherichia coli</i> produisant toxines de Shiga (STEC) - <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC).....	33
1.3.1 Sérotypes et séropathotypes des STEC.....	34
1.4 Transmission des STEC-EHEC.....	35

II-Stratégies de survie des bactéries dans l'environnement.....	36
2.1 Les biofilms.....	36
2.2 La formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	38
2.3 Les étapes de biofilm chez <i>E. coli</i>	38
2.3.1 L'adhésion aux surfaces, et la formation de microcolonies et macrocolonies.....	39
2.3.1.1 Les fimbriae de type 1	40
2.3.1.2 Les autotransporteurs.....	41
2.3.1.3 Les curli.....	42
2.3.2 Formation de la matrice extracellulaire et maturation du biofilm	45
2.3.2.1 Le poly-N-acetylglucosamine (PGA).....	46
2.3.2.2 La cellulose	46
2.3.2.3 L'acide colanique.....	47
2.3.3 Communication via <i>Quorum Sensing</i> (QS).....	47
2.3.3.1 Les homosérines lactones (AHL)	48
2.3.3.2 Autoinducteur-2	48
2.3.3.3 Autoinducteur-3	49
2.3.4 Dispersion.....	49
2.4 Régulation de la formation de biofilms.....	50
2.5 Autoagrégation.....	53
III-La formation des biofilms chez les <i>E. coli</i> produisant de Shiga-toxines	56
3.1 Persistance des STEC en dehors du réservoir	56
3.2 La capacité de formation de biofilms au sein des STEC	57
3.3 Structures associées au biofilms chez les STEC.....	59
3.4 Stratégies utilisées pour contrer les biofilms des STEC	61

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS	62
Article	63
Implication de l’auteur dans cet article	64
Authors	65
Abstract	66
Background.....	67
Methods	68
Bacterial strains and growth conditions.	68
Static biofilm formation assay.....	69
Autoaggregation assays.	69
Transposon mutagenesis in Sakai and screening of Tn10 Sakai mutant library.	70
Identification of mini-Tn10 insertion sites.....	70
Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	71
Identification and complementation of Sakai Tn10 mutants.	71
Mannose-resistant yeast agglutination test.	72
Colony morphotype in the presence of Congo red.....	72
Results	73
Curli is involved in the biofilm of EHEC strain Sakai.....	73
Sakai presents the phenotype of a strain producing curli	74
Curli is involved in the autoaggregating phenotype of Sakai.....	74
Curli is involved in the mannose-resistant yeast agglutination in Sakai.....	74
Curli is an important component in the biofilm formation of Sakai.....	745
A subset of isolates O157: H7 shows curli gene expression and curli fiber production associated with the phenotype biofilm-autoggregation	75

Discussion	75
Conclusion	79
Additional Files	79
Abbreviations	79
Authors' contributions.....	79
Author details.....	80
Acknowledgements.....	80
Competing interests	80
Funding.....	80
References.....	81
Figures & Tables	87
DISCUSSION	100
Les fibres de curli contribuent substantiellement à la formation d'autoagrégats et de biofilms chez des souches d'un sous-groupe des EHEC.....	101
La différence de niveau de production de curli entre les souches O157: H7 Sakai et EDL933 peuvent résulter de différences au niveau de la régulation des gènes codant pour curli	103
Différences dans la régulation de la production de curli au sein STEC / EHEC.....	111
Considérations finales.....	112
CONCLUSION	114
PERSPECTIVES	116
BIBLIOGRAPHIE	118
ANNEXES	139
Article 1	140
Implication de l'auteur dans cet article	141

AUTHORS.....	142
ABSTRACT	143
INTRODUCTION	144
MATERIALS AND METHODS	145
Bacterial strains and culture conditions.....	145
<i>In silico</i> evaluation of Pho boxes.....	145
Quantitative real time PCR (qRT-PCR).....	145
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	145
Static biofilm formation assay.....	146
Auto-agglutination assays.....	146
Preparation of membrane fraction.....	146
SDS-PAGE and Western blot.....	147
RESULTS.....	147
Transcriptome analysis identifies Pho regulated genes expressed during biofilm-formation	147
Activated PhoB binds the promoter region of <i>ycgV</i>	148
YcgV _{EDL933} contributes to biofilm formation by EHEC strain EDL933	148
In EDL933, <i>ycgV</i> _{EDL933} encodes a truncated AIDA-I type autotransporter	149
YcgV _{EDL933} is present in the outer membrane	149
DISCUSSION	150
YcgV _{EDL933} is a Pho regulon member	150
FUNDING	151
ACKNOWLEDGEMENTS	152
REFERENCES	153

Figures & Tables	155
Article 2	161
Implication de l’auteur dans cet article	162
Authors	163
Abstract	164
Background.....	165
Methods	166
Bacterial strains and growth conditions.	166
Mutagenesis and complementation.	166
Static biofilm assay.....	167
Flow-through biofilm assay (BioFlux device).	168
Detection of type 1 fimbriae.	169
Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	169
Results	170
NAG reduces biofilm formation of AIEC strain LF82	170
NAG reduces specific biofilm formation of LF82 by inactivating the transcriptional regulator NagC	170
NagC is involved in the first steps of biofilm formation of LF82 in presence of a shear force	170
The mutation of <i>nagC</i> impaired the production of type 1 fimbriae of LF82	171
The impact of mucus-derived sugars on biofilm formation varies among <i>E. coli</i> strains	172
Discussion	172
Conclusion	174
Additional Files	175

Additional File 1: Table S1. List of primers used in this study.....	175
Additional File 2: Figure S1. Monitoring of NAG consumption by LF82 WT, LF82 Δ <i>nagC</i> and the complemented strain when grown under static condition. Concentration of NAG was measured by mass spectrometry.....	175
Additional File 3: Figure S2. Specific biofilm formation of LF82 was evaluated in the presence or absence of mannose in either in LB or LB supplemented with NAG.	175
Additional File 4: Figure S3. The effect of the addition of mucus-derived sugars on growth of strains.....	175
Additional File 5: Figure S5. NagC consensus DNA binding sites and nucleotide BLAST of LF82 and MG1655.	175
Authors' contributions	176
Author details.....	176
Acknowledgements.....	176
Competing interests.....	176
Funding.....	176
References.....	177
Figures & Tables	181

Liste des tableaux

METHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Table 1. Strains and plasmids used in this study.....	89
Table 2. List of primers used in this study.....	90
Table 3. List of genes interrupted by the Tn10 mini-transposon according to high-throughput sequencing results.....	92

ANNEXES

Article 1

Table 1. Strains and plasmids used in this study.....	157
-------------------------------------------------------	-----

Article 2

Table 1. List of strains and plasmids used in this study.....	185
Table S1. List of primers used in this study.....	186

Liste des figures

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Pathotypes des <i>E. coli</i> pathogènes intestinales et leur façon à coloniser l'épithélium intestinal.....	30
Figure 2. Étapes de la formation de biofilm.....	39
Figure 3. Structure des fibres amyloïdes de curli (A et B). Modèle intégré pour la sécrétion de sous-unités curli. (C). Les opérons divergents <i>csgDEFG</i> et <i>csgBAC</i> codant pour le système de biogenèse de curli (D).....	43
Figure 4. Réseau complexe de régulation de la formation de biofilms dans la majorité des souches d' <i>E. coli</i>	52
Figure 5. Relation entre l'autoagrégation et la formation de biofilm.....	54
Figure 6. Autoagrégation chez <i>E.coli</i>	55
Figure 7. Rôle de la formation de biofilm dans la transmission et la persistance des STEC hors d'un hôte animal.....	57

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Figure 1. Expression of genes of interest in 24 h-biofilm cells of Sakai and EDL933 strains by qRT-PCR.....	93
Figure 2. Curli fibers production evidenced by the colony morphotypes of Sakai, EDL933, Sakai Tn10 mutants and complemented mutants.....	94
Figure 3. Autoaggregation test of Sakai, EDL933, Sakai Tn10 mutants and complemented mutants.....	95
Figure 4. Yeast agglutination test in the absence and presence of α -D-mannopyranoside in Sakai, transposon mutants and complemented strains.....	96
Figure 5. Biofilm formation test of a) Sakai and EDL933, and b) Sakai Tn10 mutants and complemented mutants	97
Figure 6. Colonies morphotypes of seropathotype A EHEC strains O157: H7.....	98

Figure 7. Expression of curli genes in 24 h-biofilm cells, of Sakai-like and EDL933-like strains, by qRT-PCR.....	99
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

DISCUSSION

Figure 8. Régulation de la région intergénique entre les opérons codant pour curli.....	105
Figure 9. Certaines des protéines régulatrices impliquées, en tant qu'activateurs et / ou répresseurs, dans l'expression des opérons de curli (Evans et Chapman, 2014).....	106
Figure 10. Alignements des séquences (GenBank) du gène <i>rpoS</i> (A) et de la protéine RpoS (B), des souches Sakai et EDL933, en utilisant Blastn et Blastp.....	107, 108
Figure 11. Séquences (GenBank) du gène <i>cpxR</i> (inverses complémentaires) (A) et de la protéine CpxR (B), des souches Sakai et EDL933.....	109, 110
Figure 12. Modèle dérivé de celui proposé par Trunk et al. 2018, qui pourrait expliquer la formation des phénotypes à l'étude chez la souche EHEC O157: H7 Sakai, en fonction d'une possible surproduction des fibres de curli.....	113

ANNEXES

Article 1

Figure 1. PhoB regulates expression of <i>ycgV</i> _{EDL933} and binds to its promoter region.....	152
Figure 2. Truncated <i>YcgV</i> _{EDL933} is involved in EHEC O157: H7 EDL933 biofilm formation.....	153, 154
Figure 3. Genomic context and comparison of <i>YcgV</i> homologues in different <i>E. coli</i> strains.....	155
Figure 4. <i>YcgV</i> _{EDL933} is detected in the outer membrane fraction.....	156

Article 2

Figure 1. Impact of mucus-derived sugars on specific biofilm formation of AIEC strain LF82.....	180
Figure 2. <i>NagC</i> positively influences the biofilm formation of AIEC strain LF82.....	181
Figure 3. The biofilm formation is delayed in <i>nagC</i> mutant of LF82 in a microfluidic system.....	182
Figure 4. <i>NagC</i> influences the expression and the production of type 1 fimbriae of LF82.....	183
Figure 5. Mucus-derived sugars can influence the specific biofilm formation of different strains of <i>E. coli</i>	184

Figure S1. Monitoring of NAG consumption by LF82 WT, LF82 Δ nagC and the complemented strain when grown under static condition.....188

Figure S2. The effect of competition with mannose is similar to the addition of NAG on the reduction of the biofilm formation of LF82.....189

Figure S3. The effect of the addition of mucus-derived sugars on growth of strains.....190

Figure S4. NagC consensus DNA binding site generated by Weblogo from known NagC binding sequences [13, 16, 41, 42].....191

Liste des sigles et abréviations

A/E: Attachement et Effacement

Ag43: Antigène 43

AHL: homosérines lactones sous forme acylée (N-Acyl Homoserine Lactone)

AI: Auto-Inducteur

AIDA: Adhésine Impliquée dans l'Adhésion Diffuse

AIEC: *E. coli* adhérente et invasive (Adherent invasive *E. coli*)

AMPC: AMP cyclique

ARNm: ARN messagers

cDNA: ADN complémentaire (complementary DNA)

CEACAM6: molécules d'adhésion cellulaire associées à l'antigène carcino-embryonnaire 6

CR: Rouge Congo (Congo Red)

DAEC: *E. coli* adhérentes de manière diffuse (Diffusely adherent *E. coli*)

DGC: diguanylate cyclase

di-GMPc: di-GMP cyclique

EAEC: *E. coli* entéroagrégative (Enteraggregative *E. coli*)

EHEC: *E. coli* entérohémorragique (Enterohemorrhagic *E. coli*)

EIEC: *E. coli* enteroinvasive (Enteroinvasive *E. coli*)

EPEC: *E. coli* entéropathogénique (Enteropathogenic *E. coli*)

ETEC: *E. coli* entérotoxigène (Enterotoxigenic *E. coli*)

ExPEC: *E. coli* pathogène extra-intestinal (Extra-intestinal pathogenic *E. coli*)

InPEC: *E. coli* pathogène intra-intestinal (Intra-intestinal pathogenic *E. coli*)

LB: Milieu de culture LB (Lysogeny Broth)

LEE: Locus d'Effacement des Entérocytes

LPF: Long fimbriae polaire (Long Polar Fimbriae)

LPS: Lipopolysaccharide

MNEC: *E. coli* associées à la méningite néonatale (Neonatal Meningitis *E. coli*)

MR: mannose-résistant

NAG: N-acétyl-glucosamine

OD: Densité optique (Optical Density)

PBS: Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)

PGA: Poly- β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine

ppGpp: guanosine tetraphosphate

(p)ppGpp: guanosine pentaphosphate

QS: *Quorum Sensing*

RpoS: ARN polymerase sous-unité S

SBF: Formation de biofilm spécifique (Specific Biofilm Formation)

SEPEC: *E. coli* septicémique (Septicemic *E. coli*)

SHU: Syndrome Hémolytique et Urémique

SST3: Système de Sécrétion de Type 3

STEC: *E. coli* producteur de Shiga-toxine (Shiga-Toxin producing *E. coli*)

Stx: Toxines de Shiga (Shiga-toxines)

UPEC: *E. coli* uropathogène (Uropathogenic *E. coli*)

VTEC: *E. coli* vérotoxigène (verotoxigenic *E. coli*)

À ma mère, qui a été et sera toujours mon guide.

À ma belle et inconditionnelle famille.

*À la mémoire de mes grands-parents Irma et Francisco,
toujours présents.*

*« La gratitude n'est peut-être pas la vertu la plus importante,
mais elle est la mère de toutes les autres ».*

Marco Tulio Cicerón

Remerciements

Cette maîtrise a été l'accomplissement d'un objectif et d'une étape importante dans ma vie. Elle m'a permis d'apprendre beaucoup et de surmonter plusieurs défis, notamment le fait de réaliser ce projet loin de chez moi. Pour ces raisons, il m'est essentiel de remercier toutes les personnes qui ont rendu possible la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, je remercie infiniment ma superviseuse, la Dre. Josée Harel, de m'avoir ouvert les portes de son groupe de recherche, de m'avoir donné la chance d'être son élève et pour m'avoir permis d'apprendre et de grandir scientifiquement et personnellement. La Dre. Josée Harel est une personne que j'admire, non seulement pour la passion qu'elle met dans la science, mais également car elle me confirme qu'un grand scientifique est celui qui combine sa grande qualité professionnelle avec d'excellentes qualités humaines, telles que sa générosité, son humilité, son respect pour tous et son humanité.

Je remercie les Drs. France Daigle et John Morris Fairbrother, d'avoir accepté de faire partie du jury d'évaluation de mon mémoire, car grâce à leurs grandes connaissances, leur commentaires, corrections et suggestions rendront ce travail meilleur.

De même, je remercie les Drs. Mario Jacques, Christopher Fernández Prada et John M. Fairbrother, membres de mon Comité Conseil, pour leurs précieux conseils et recommandations qui ont permis d'enrichir ce projet.

Aux anciennes et actuelles secrétaires Diane Rodier, Christine Blondin, Isabelle Flibotte, Nancy Bisailon et Hélène Boucher, merci pour leur gentillesse, d'avoir montré le meilleur caractère et la plus grande disposition dans chaque démarche dont j'ai eu besoin, même si elles font leur travail. C'est très agréable de rencontrer des gens comme vous. Encore une fois, merci.

À tous les professeurs des cours et activités scientifiques, pour les connaissances transmises et les formations dispensées.

À Claudia Duquette, pour son aide et pour les précieux conseils microbiologiques, qu'elle m'a donnés, toujours avec le sourire.

À Marco Langlois, pour sa patience dans les journées de photos de mes expériences, toujours accompagné de sa bonne humeur et de son excellent caractère.

À notre professeure de français Marie-Andrée Bousquet, pour nous avoir permis d'améliorer cette langue dans les cours qu'elle a enseignés aux étudiants internationaux à la FMV, pour toujours être intéressée par nous et nos réalisations, et pour son aide inestimable à chaque fois que nous en avons eu besoin, sans rien attendre en retour, juste nos sincères remerciements.

À mes anciens collègues de laboratoire, Guillaume Le Bihan et Jean-Félix Sicard, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé et pour leur volonté de m'aider. À Philippe Vogeeler, mon cher « colega », pour qui je ressens une gratitude remarquable, pour toutes les connaissances et expériences partagées et l'aide précieuse. Pour sa confiance, pour sa bonne humeur, et car ensemble nous avons formé une grande équipe.

À mes ami(e)s de la FMV. À Coralie (Coco), d'avoir été ma première amie ici, pour sa générosité, son aide inconditionnelle chaque fois que j'en ai eu besoin et pour sa sincère amitié. À Noélie, pour son noble esprit, et qui m'a donné son aide désintéressée, tant en français qu'en laboratoire. À mon groupe spécial d'amis latins, Cami, Lauri S., Carlos, Mary, Maria, Lau F. et Adri, merci pour ce temps précieux passé ensemble en espagnol, l'excellente compagnie et la chaleur humaine. De même, à mes chers cubains Yai, Joan, Pao et Wil, pour être une extension de ma famille à St Hyacinthe, pour les nombreux moments partagés et pour la fraternité.

À mes chers amis Rey, Yase, Javi, Vikita, Aldo, Yane, Edgar, Marbe, Anita, Edu et Mary parce qu'ils ont été ma famille cubaine au Québec, avec qui nous partageons le soulagement, les joies, les réalisations, les célébrations. Merci pour l'amour, le soutien et les bonnes vibes. Et je remercie particulièrement mes chers Mary et Edu, de nous avoir ouvert la porte à cette opportunité qui a changé nos vies, de nous avoir donné inconditionnellement leur maison, leur espace et leur fraternité pendant tant d'années.

À mes frères dans la vie: Yudy, Rey et Isa, pour être proches au loin, et Nayi et Ale, pour l'immense chance de les avoir à proximité. Merci pour cette totale confiance, complicité et confort qui donnent près de 20 ans d'amitié. À tous, en plus, pour ces petits neveux hérités, de merveilleux cadeaux.

À mes chers Dulci, Jose, Lily, Orozco, Eni, Rene, Adita, Lourdes, Angela, Elena, Ana et Maria, de m'avoir encouragé à relever ce défi, et pour la sincère amitié.

À mes amis Ody, Eduard, Ana, Yare, Eli et Yan, merci d'être et de faire partie de ma vie.

À nos chers Hélène et Richy, merci de nous avoir spontanément ouvert les portes de votre maison et de votre vie, pour nous avoir fait sentir comme dans une famille. Merci également, de nous avoir permis de connaître et d'aimer cet être unique et merveilleux, Mama Rose.

Bien sûr, immense reconnaissance à toute ma famille. Tout d'abord, mes grands-parents Irma et Francisco, qui (bien qu'ils ne soient plus ici), ont été et sont nos piliers, pour leur empreinte indélébile, pour les enseignements et l'amour. Une partie de ce que je suis, je vous le dois. À ma belle-famille, pour son souci constant et son affection. À mes chers tantes et oncles, pour leur présence et leur soutien total. À mes sœurs, mon frère et mes cousins, merci pour l'amour, et de m'avoir exhorté à suivre mes enjeux, en sachant que vous voyez en moi l'exemple de la sœur aînée.

À mes parents, pour avoir contribué à ma vie de nombreuses valeurs, et pour l'effort de nous faire de meilleures personnes.

Un remerciement particulier à ma mère, à qui je dois toute mon existence. Merci pour ton amour infini et inconditionnel, qui ne demande rien et donne tout. Merci d'être ma force, mon guide, mon soutien et ma lumière, l'être le plus grand et le plus important de ma vie. Chaque triomphe et chaque objectif conquis par tes filles sont le reflet vivant de tout ce que tu as fait pour nous.

Et bien sûr, mes plus grands remerciements à mon conjoint, Yunion, d'avoir accepté de me suivre sur ce projet et de se l'approprier. Merci d'être à mes côtés, d'être mon partenaire de vie et mon ami, de son soutien inconditionnel au quotidien, de la force qu'il m'a transmise dans les moments difficiles, surtout, de sa tendresse et de son amour si grand. Sans lui, rien de ce que j'ai accompli ici n'aurait été possible.

À tous, merci ...

INTRODUCTION

Les souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga- toxines (STEC) sont des agents pathogènes d'origine alimentaire et hydrique, qui provoquent des toxi-infections collectives modérées à sévères chez l'homme. Parmi eux, le sérotype O157: H7 d'*E. coli* entérohémorragique (EHEC) (Karmali et al., 2003), est fréquemment responsable de cas sporadiques et d'éclosions de gastroentérite. Ces infections peuvent entraîner des complications cliniques parfois mortelles, telles que la colite hémorragique et parfois, le syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Etcheverria and Padola, 2013). Les EHEC O157: H7 représentent un des sérotypes le plus souvent mis en évidence au Canada, et aussi au Québec.

Les réservoirs des STEC sont essentiellement les bovins et autres ruminants, qui portent ces bactéries de façon asymptomatique dans leur tractus intestinal, et parfois aussi sur leurs peau (Ferens and Hovde, 2011). La transmission à l'homme, ainsi que l'apparition d'éclosions, sont fréquemment associées à la consommation de produits alimentaires contaminés. La viande hachée de bœuf insuffisamment cuite est la première origine de ces intoxications, cependant la contamination du lait par des STEC capables de se développer et de persister sur l'ensemble de la filière, est un problème majeur de sécurité alimentaire. Également, la contamination fécale de l'eau potable et de divers aliments naturels tels que les légumes frais ou les fruits crus, ainsi que la contamination croisée donnent lieu à des infections par cet agent pathogène (Ferens and Hovde, 2011).

Lorsqu'excrétées dans les fèces des réservoirs, les STEC peuvent encore se propager dans l'environnement. Elles doivent alors adapter leur mode de vie pour survivre et persister dans des conditions hostiles, par exemple en formant de biofilms (Serra et al., 2013; Tremblay et al., 2015; Vogeleer et al., 2015). Les biofilms sont des communautés microbiennes, enfermées dans une matrice extracellulaire autoproduite, qui sont attachées à différentes surfaces (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Jacques et al., 2010). Ces structures complexes se développent à différents stades de la maturation du biofilm, en commençant par la colonisation d'une surface, et suivi par un attachement irréversible et la croissance des bactéries en microcolonies ou des agrégats. Ils se poursuivent par la formation de la structure tridimensionnelle et la maturation du biofilm, et enfin par la dispersion, favorisée par certains facteurs bactériens et/ou environnementaux (Kaplan, 2010). Il est connu que plusieurs souches STEC possèdent la capacité à former des biofilms

(Pratt and Kolter, 1998; Serra et al., 2013; Tremblay et al., 2015; Vogeleeer et al., 2015). Ces biofilms permettent une protection contre l'environnement pauvre en nutriments et les désinfectants (Marouani-Gadri et al., 2009; Ryu and Beuchat, 2005; Ryu et al., 2004; Villegas et al., 2013). Cela rend difficile le contrôle de la contamination par des STEC dans les chaînes de production des aliments (Vogeleeer et al., 2015). En effet, plusieurs structures extracellulaires impliquées dans la formation de biofilms telles que le curli, la cellulose, la poly-N-acétylglucosamine et l'acide colanique favorisent la colonisation des végétaux et l'adhérence aux différentes surfaces souvent présentes dans les usines de transformation de la viande (Vogeleeer et al., 2015).

Dans des conditions de stress, les bactéries peuvent également former des autoagrégats. L'autoagrégation des *E. coli* est décrite comme la formation de groupes de cellules qui forment une floculation macroscopique (Hasman et al., 1999). Il est proposé que l'autoagrégation contribue à un des stades initiaux de la formation de biofilms. La production de nombreuses adhésines telles que les fimbriae de type 1, les fimbriae longues polaires, les fimbriae F9, Ag43 et curli a été associée à la formation d'autoagrégats (Barnhart and Chapman, 2006; Beloin et al., 2004; Bieber et al., 1998; Römling et al., 1998; Römling et al., 2000; Schembri et al., 2001; Serra et al., 2013; Trunk et al., 2018). La croissance sous forme d'autoagrégats et de biofilms de plusieurs souches STEC confère à celles-ci des avantages qui contribueraient à leur persistance, dans les milieux naturels ainsi qu'industriels.

Dans un travail précédent, nous avons démontré que la souche EHEC Sakai fait partie d'un sous-groupe de souches O157: H7 qui a la capacité d'autoagglutiner et de former une importante quantité de biofilm, ce qui aurait un impact sur leur persistance et leur transmission aux futurs hôtes (Vogeleeer et al., 2015).

Ainsi, notre hypothèse est qu'il existe certains facteurs présents chez la souche Sakai qui sont responsables de la corrélation positive entre leur haut niveau d'autoagrégation et leur capacité à former des biofilms. Nous considérons qu'il est donc important de comprendre le mécanisme de ce phénomène afin de développer des méthodes préventives ciblées.

Les objectifs de ce projet visent à:

- Identifier les gènes responsables de ce phénotype, et par conséquent le(s) facteur(s) impliqué(s) lors de l'autoagrégation et la formation du biofilm chez la souche de référence *E. coli* O157: H7 Sakai comme modèle.
- Vérifier l'association positive entre le(s) facteur(s) identifié(s) et la capacité accrue d'autoagrégation/de formation de biofilm d'autres souches cliniques EHEC O157: H7.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I- Les *Escherichia coli*

1.1 Généralités des *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie bacille à Gram-négatif, anaérobie facultative, mobile et non sporulée. Son nom a été attribué en l'honneur de son découvreur, le bactériologiste allemand-autrichien Theodor Escherich, qui l'a observée pour la première fois en 1885 (Etymologia, 2015). *E. coli* est un des micro-organismes le plus étudié (Dunne et al., 2017) et fréquemment utilisé comme modèle en laboratoire, en raison de son taux de croissance et de ses faibles besoins nutritionnels.

Les *E. coli* appartiennent à la famille *Enterobacteriaceae*. Elles font généralement partie du microbiote intestinale de l'humain et des animaux à sang chaud, où elles s'établissent comme des bactéries commensales. Dans les intestins, les *E. coli* commensaux empêchent l'établissement d'espèces bactériennes plus néfastes pour l'équilibre intestinal de l'hôte (Freter et al., 1983). Dans de rares cas, les souches commensales sont impliquées dans des infections intestinales de patients immunosupprimés ou en cas de rupture de la barrière gastro-intestinale.

Ils existent beaucoup de souches différentes d'*E. coli*, ainsi qu'une grande diversité génétique au sein de cette espèce bactérienne. Il y a nombreuses façons de les classer; le plus souvent, on distingue deux groupes: les *E. coli* commensaux et les *E. coli* pathogènes. Elles peuvent être classées selon leur phylogénie, c'est-à-dire, la relation génétique avec un ancêtre commun, qui la divise en sous-groupes A, B1, B2, D1, D2/F et E (Dunne et al., 2017). L'une des classifications la plus utilisée est celle des sérotypes, basés sur les différents antigènes de surface que cette bactérie possède. Ainsi, l'antigène O fait référence au type de lipopolysaccharide, l'antigène H fait référence au type de flagelle et l'antigène K fait référence au type de capsule (Evans Jr and Evans, 1983). Les souches sans flagelles sont non mobiles (NM).

1.2 Les *E. coli* pathogènes

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont celles qui colonisent un hôte sain, entraînant des infections de gravité variée dans l'intestin, les voies urinaires, la méningite, la septicémie, entre autres. Elles

disposent, en plus des gènes essentiels communs à l'ensemble des *E. coli*, des gènes codant pour des facteurs de virulence et d'adaptation qui contribuent à l'établissement de la maladie chez l'hôte. L'ADN chromosomique des souches pathogènes subit de nombreux réarrangements. Les gènes codant pour les facteurs de virulence sont fréquemment acquis par transfert horizontal et les éléments génétiques comme: les îlots de pathogénicité, transposons, intégrons, phages ou plasmides peuvent être mobilisés dans d'autres souches pour créer de nouvelles combinaisons de facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence codent en autres, pour des adhésines, systèmes de sécrétion et des toxines qui permettent à la bactérie de coloniser un plus grand nombre d'environnements.

Les souches pathogènes d'*E. coli* ont été également classées en différents pathotypes selon les maladies qu'elles causent et selon l'ensemble de leurs facteurs de virulence (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004). Parmi les souches pathogènes, on retrouve des *E. coli* causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) telles que la septicémie (SEPEC), la méningite néonatale (MNEC) et des infections urinaires (UPEC). D'autres *E. coli* vont plutôt causer des maladies intestinales (InPEC) (**Figure 1**). On parle des *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), entéro-pathogènes (EPEC), productrices de Shiga-toxines (STEC) comprenant son sous-ensemble le plus pathogène: *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les entéroagrégatives (EAEC), enteroinvasives (EIEC) et adhérentes de manière diffuse (DAEC), ainsi que le pathotype d'*E. coli* adhérent / invasif (AIEC) plus récemment décrit et caractérisé. Ce dernier a été impliqué dans des maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Darfeuille-Michaud, 2002; Eaves-Pyles et al., 2008), et possède plusieurs facteurs de virulence retrouvés chez les ExPEC.

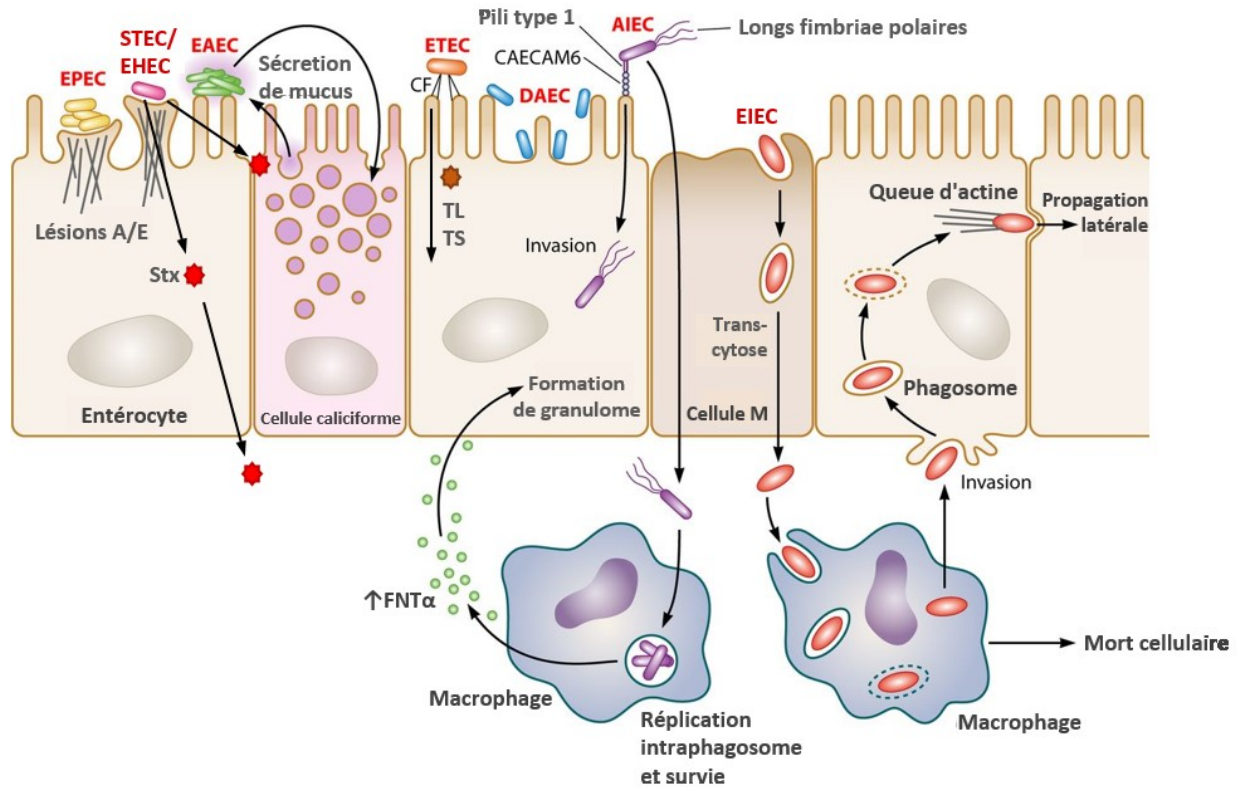


Figure 1. Pathotypes des *E. coli* pathogènes intestinales et leur façon à coloniser l'épithélium intestinal.

Les principaux mécanismes d'adhésion et/ou invasion des pathotypes EPEC, EHEC, EAEC, ETEC, DAEC et AIEC sont illustrés. Lésion A/E: lésions d'attachement et effacement (A/E) de microvillosités aux cellules épithéliales intestinales; Stx: Shiga-toxines; CF: facteur de colonisation; TL; toxine thermolabile, TS; toxine termosensible; CEACAM6: l'antigène carcinoembryonnaire 6; FNT α : facteur de nécrose tumorale α . Figure adaptée de: (Croxen et al., 2013).

1.2.1 Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont reconnues comme la principale cause de la diarrhée du voyageur chez l'humain (Nataro and Kaper, 1998). Elles possèdent des facteurs de colonisation lui procurant un tropisme pour le petit intestin (Croxen and Finlay, 2010; Kalita et al., 2014). En plus, les ETEC produisent des entérotoxines thermostable et thermolabile. Ces toxines sont responsables de la perturbation de l'homéostasie des fluides chez l'hôte, ce qui entraîne la production d'une diarrhée (Kalita et al., 2014).

1.2.2 Les *E. coli* entéroagrégatives (EAEC)

Bien qu'elles causent des cas sporadiques de diarrhée, les EAEC sont également impliquées dans la diarrhée persistante chez les enfants et les adultes dans les pays en développement et les pays développés (Kaper et al., 2004). Elles colonisent généralement le petit intestin et le colon (Croxen and Finlay, 2010; Nataro and Kaper, 1998). Une caractéristique phénotypique des EAEC est leur adhésion en agrégat au niveau de la muqueuse intestinale de leur hôte, principalement médiée par les fimbriae d'adhérence agrégative. Cette agrégation particulière mène à la formation d'une structure mucoïde épaisse (Kalita et al., 2014; Kaper et al., 2004). Les EAEC vont également produire des toxines causant des dommages au niveau de la muqueuse intestinale (Croxen and Finlay, 2010).

1.2.3 Les *E. coli* enteroinvasives (EIEC)

Les EIEC sont des souches pathogènes intracellulaires facultatives et provoquent une dysenterie bacillaire semblable à celle des espèces de *Shigella*. Les EIEC sont génétiquement, biochimiquement et pathologiquement liées à *Shigella* spp. Elles produisent la diarrhée aqueuse et la dysenterie. Dans la muqueuse du colon, ces bactéries se lient d'abord et envahissent les cellules épithéliales, lysent la vésicule endocytique, se multiplient dans le cytoplasme, se déplacent à l'intérieur du cytoplasme, et se projettent vers les cellules adjacentes pour se propager de cellule en cellule (Bhunja, 2018).

1.2.4 Les *E. coli* adhérentes de manière diffuse (DAEC)

Les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) provoquent une diarrhée infantile et produisent une adhérence diffuse (DA) aux lignées de cellules HEp-2 en culture, qui est médiée par une adhésine fimbriaire, appelée F1845. L'adhésion conduit à un réarrangement du cytosquelette, détruisant ou réarrangeant partiellement la structure des microvillosités. L'adhésion affecte également la perméabilité paracellulaire en réarrangeant certaines protéines dans les jonctions serrées. Le locus de l'effacement des entérocytes (LEE) a été également trouvé dans des DAEC, et il est éventuellement porteur des gènes nécessaires aux lésions d'attachement / effacement et aux

événements de signalisation similaires à EPEC. Les personnes âgées deviennent des porteurs asymptomatiques des DAEC (Bhunias, 2018).

1.2.5 Les *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC)

Les AIEC forment un pathotype plutôt récemment reconnu. Ces *E. coli* ont été isolées de l'iléon de patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale connue comme maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Elles étaient caractérisées par leur capacité à adhérer aux cellules intestinales. Il a ensuite été démontré qu'en plus d'être invasives (Boudeau et al., 1999), elles peuvent également survivre dans les macrophages et induire de l'inflammation en partie via la production de facteur de nécrose tumorale α (Glasser et al., 2001). De plus, ces *E. coli* ne possèdent pas de gènes codant pour des facteurs de virulence fréquemment trouvés chez les souches d'*E. coli* causant des maladies entériques aiguës (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Les AIEC utilisent leurs fimbriae de type 1 pour reconnaître des molécules d'adhésion cellulaire associées à l'antigène carcinoembryonnaire 6 (CEACAM6) présentes au niveau des cellules intestinales de l'iléon (Barnich et al., 2007). Une autre caractéristique phénotypique des AIEC est leur plus forte capacité à former des biofilms que les souches intestinales non-AIEC (Martinez-Medina et al., 2009).

1.2.6 Les *E. coli* entéropathogéniques (EPEC)

Les EPEC sont souches hautement invasives et provoquent une réponse inflammatoire et une diarrhée potentiellement mortelle chez les enfants et les nourrissons (Bhunias, 2018). Elles colonisent essentiellement le petit intestin et adhèrent intimement aux cellules épithéliales, produisant des lésions d'attachement et effacement (A/E) de microvillosités aux cellules épithéliales intestinales (Bhunias, 2018; Kalita et al., 2014). Ce phénotype est dû à un groupe de gènes présent sur le locus d'effacement des entérocytes (LEE). Le premier gène de l'opéron LEE, *ler*, code pour un activateur qui régule l'expression du LEE (Le Bihan et al., 2017). Le système de sécrétion de type III (SST3) est une des principales composantes du LEE car il permet aux bactéries attachées aux entérocytes d'injecter des protéines effectrices dans le cytoplasme de ces cellules (Ochoa et al., 2008). Une réorganisation du cytosquelette de l'entérocyte se produit, ce qui

conduit à la formation d'une structure similaire à un piédestal où les bactéries restent incrustées, permettant un contact intime EPEC-cellule épithéliale (Deborah Chen and Frankel, 2005). La bactérie *Citrobacter rodentium* cause également pathologie des lésions A/E dans les cellules de l'intestin des souris, c'est pourquoi elle est utilisée comme modèle murin de choix pour l'étude de ce type de lésion (Nataro and Kaper, 1998).

1.3 Les *Escherichia coli* produisant toxines de Shiga (STEC) - *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

Les STEC ont la caractéristique de produire au moins une variante d'une toxine connue comme Shiga-toxine (Stx), nom dérivé de la cytotoxine produite par *Shigella dysenteriae* de sérotype 1 (O'Brien et al., 1982). Chez *E. coli*, il existe deux types de Shiga-toxines, Stx1 et Stx2, qui ont le même mode d'action mais sont immunologiquement distinctes (Melton-Celsa, 2014; O'Brien et al., 1982). Les toxines Stx1 et Stx2 sont codées respectivement par les gènes *stx1AB* et *stx2AB* portés sur des prophages intégrés dans le chromosome des STEC. Comme il a été démontré que la Shiga-toxine a des effets cytotoxiques irréversibles sur la lignée cellulaire Véro dérivées du rein (Konowalchuk et al., 1977), cette toxine est également appelée vérotoxine (VT). Alors les STEC peuvent être aussi nommés de façon interchangeable comme *E. coli* producteur de vérotoxine (VTEC). Toutes les souches STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme.

E. coli entérohémorragique (EHEC) est un sous-ensemble des STEC colonisant principalement le gros intestin et qui est répandu dans les pays industrialisés. Elles causent diarrhées aqueuses, parfois sanglantes ou une colite hémorragique (CH) (Kaper et al., 2004). Les cas plus sévères lors de la pathogénèse des EHEC peuvent développer le syndrome hémolytique urémique (SHU), potentiellement mortel (Croxen and Finlay, 2010). Plusieurs facteurs de virulence sont associés à ce pathotype. Les EHEC, comme les EPEC, possèdent l'îlot de pathogénicité LEE dans le chromosome, leur permettant de produire un SST3 et de causer aussi des lésions A/E aux entérocytes (Kaper et al., 2004).

Un autre facteur de virulence important chez les STEC/EHEC est la production des Shiga-toxines (Farfan and Torres, 2012). Les Stx (ou VT) sont des toxines AB₅, composées d'une sous-unité enzymatique active A (codée par *stx1A* ou *stx2A*) entourée de 5 sous-unités B (codées par *stx1B*

ou *stx2B*) responsables de la liaison de la toxine au récepteur. Lorsqu'elles sont produites, les Shiga-toxines traversent l'épithélium intestinal et arrivent à la circulation sanguine. Une fois dans le sang, le pentamère de sous-unités B reconnaît les récepteurs globotriosylcéramide (Gb3) présents à la surface des cellules endothéliales, incluant l'endothélium vasculaire (en causant colite hémorragique) et des cellules glomérulaires rénales (causant le SHU). Après avoir fixé son récepteur, Stx est internalisée par endocytose, atteint l'appareil de Golgi et voyage par voie rétrograde jusqu'au réticulum endoplasmique. Alors une protéolyse partielle clive la sous-unité A en deux parties par réduction du pont disulfure. Il en résulte une libération intracellulaire de N-glycosidase active (A1), capable d'hydrolyser l'ARN ribosomal 28S, constituant de la sous-unité ribosomale 60S. Cette modification inhibe alors la fonction d'élongation du ribosome, bloque la synthèse protéique et conduit par conséquent à la mort cellulaire (Melton-Celsa, 2014). Selon des rapports épidémiologiques, le développement de SHU est plus souvent associé à Stx2 qu'à Stx1 (Boerlin et al., 1999).

1.3.1 Sérotypes et sérotypotypes des STEC

Le sérotype O157: H7 a été le premier sérotype STEC identifié comme responsable d'une épidémie causée par la consommation des hamburgers de viande de boeuf haché contaminée, en 1982 (O'Brien et al., 1993). Contrairement à la plupart des *E. coli*, les souches O157: H7 ne sont généralement pas capables de fermenter le sorbitol et n'ont pas d'activité β -glucuronidase (dégradation des glucides). Le sérotype O157: H7 est reconnu comme principal responsable d'éclosions d'infection aux EHEC dans les pays développés (Croxen and Finlay, 2010) notamment en Amérique du Nord. Au cours des dernières années, il a été à l'origine d'importantes éclosions aux États-Unis et au Canada, associées à des aliments contaminés tels que la viande hachée et des légumes crus, tels que la laitue romaine, selon des rapports du "Center for Disease Control and Prevention" (CDC) et "Public Health Agency of Canada" (PHAC) (<https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html> et <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>).

Il existe d'autres sérotypes non-O157 qui provoquent également des éclosions majeures, particulièrement celles appartenant à des sérogroupes qui ont appelé le « Big six »: O26, O45, O103, O111, O121 et O145 (Wang et al., 2012). Bien que l'isolement des STEC non-O157 impliqués dans des éclosions se soit accru au long des dernières décennies, l'impact de ces agents pathogènes sur la santé publique est moins documenté que pour le O157, probablement en raison d'un diagnostic et d'une surveillance insuffisants.

Dû qu'il existe des différences de virulence entre les sérotypes de STEC, en fonction du type d'éclosion et de la gravité de l'infection, elles ont été classées en cinq séropathotypes (de A à E) (Karmali et al., 2003). Le séropathotype A comprend les isolats des sérotypes O157:H7 et O157:NM, qui sont les plus souvent à l'origine des éclosions de cas de SHU et de CH sévères. Le séropathotype B comprend les souches de sérotype retrouvé dans le « Big six » (O26: H11, O103: H2, O111: NM, O121:H19, O145: NM), responsables d'éclosions occasionnelles et peuvent causer le SHU et CH. Le séropathotype C inclut des souches de sérotypes rarement isolées de cas cliniques mais pour lesquels des symptômes graves étaient associés tel que O91:H21 et O113:H21. Le séropathotype D comprend des souches de sérotypes associés à des diarrhées qui n'ont pas été reliées à des épidémies et qui ne sont pas associées à des SHU. Finalement dans le séropathotype E se trouvent des souches STEC animales de sérotypes non impliqués dans les maladies humaines.

1.4 Transmission des STEC

Les bovins constituent le réservoir naturel des STEC qui sont généralement présents dans les intestins de ces animaux, spécifiquement dans la partie terminale du rectum (Naylor et al., 2005), sans causer de maladie. De même, les STEC ont été isolés des excréments d'autres espèces d'animaux tels que les poulets, chèvres, moutons, cochons, chiens, chats et mouettes (Ferens and Hovde, 2011; Persad and LeJeune, 2014). En tant qu'agents zoonotiques, la propagation des STEC dans l'environnement est directement ou indirectement liée à l'animal. Les aliments d'origine animale, en particulier la viande de bœuf haché, ont été impliqués dans de nombreuses éclosions aux États-Unis, au Canada et en Europe (FAO/WHO, 2018).

Les bovins acquièrent les STEC des environnements précédemment contaminés, et les bactéries sont après excrétées dans l'environnement par les selles et la salive, pour ensuite contaminer les aliments et les eaux potable et souterraine. L'ingestion d'aliments crus ou mal cuits contaminés par les STEC est la voie la plus habituelle de transmission. La consommation de viande du bœuf haché insuffisamment cuit a été surtout impliquée dans les cas d'infections à l'EHEC. D'autres aliments, tels que des saucisses crues, du lait cru, du yaourt, de la mayonnaise, du fromage au lait cru, du cidre de pomme, des fruits et des légumes, ont été aussi impliqués dans des éclosions et cas sporadiques ((OMS), 2019; Bhunia, 2018; FAO/WHO, 2018). Un nombre croissant de flambées est dû à la consommation des fruits et des légumes, tels que le chou, les épinards et la laitue contaminées possiblement par le contact avec les excréments d'animaux domestiques ou sauvages à un certain stade de culture ou de manipulation.

Les STEC ont également été isolées dans des masses d'eau (telles que des étangs et des ruisseaux), des puits et des abreuvoirs. Elles ont également survécu pendant des mois dans le fumier et les sédiments des abris. La transmission par l'eau a été rapportée, à la fois par de l'eau de boisson contaminée et par des eaux de loisirs ((OMS), 2019). Le contact de personne à personne est aussi un mode de transmission important par voie orale-fécale. Un bref contact physique sert à transmettre la bactérie, car il est connu qu'une dose infectante de 10 à 100 cellules suffit à provoquer la maladie (Strachan et al., 2005; Teunis et al., 2004).

II-Stratégies de survie des bactéries dans l'environnement

2.1 Les biofilms

Dans l'environnement, généralement les bactéries ne vivent pas sous forme de cellules libres en suspension (cellules planctoniques), mais elles croissent principalement dans un mode de vie "sessile", en train de former des communautés complexes telles que les biofilms (Hall-Stoodley et al., 2004; Kolter and Greenberg, 2006; Lopez et al., 2010). Les biofilms sont des agrégats de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) enfermés dans une matrice de polymère extracellulaire autoproduite, et qui se lie à une surface biotique ou abiotique

(Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Jacques et al., 2010). Ils peuvent se trouver aussi sous forme de biofilms flottants (appelés pellicules) aux interfaces liquide-air (Vaccari et al., 2017). Les biofilms peuvent contenir une seule ou plusieurs espèces bactériennes à la fois (Moons et al., 2009), et il va s'établir lorsque les bactéries passent d'un état planctonique à un état lié à la surface.

Les biofilms se produisent en plusieurs étapes, en commençant par l'attachement initial, suivi du passage d'une fixation réversible à irréversible. Par la suite, il y a un développement précoce de l'architecture de biofilm, pour passer à la formation de la microcolonie et de la macrocolonie. À ce moment-là, le biofilm devient mature et prend une structure tridimensionnelle, à l'intérieur de laquelle les bactéries sont protégées du milieu externe. Finalement, sous l'influence de plusieurs facteurs, les bactéries peuvent se détacher et redevenir planctonique, pour se disperser et conquérir nouveaux endroits (Flemming et al., 2016; Van Houdt and Michiels, 2005).

La formation de biofilm est un processus dynamique qui peut être influencé par des nombreux facteurs environnementaux (Reisner et al., 2006). Cette forme de croissance procure des avantages pour les microorganismes vivant au sein du biofilm, tels que l'échange de gènes et de nutriments. Également, les bactéries restent protégées des plusieurs défis notamment la dessiccation, les bactériophages, les amibes de l'action des biocides utilisés dans les processus industriels (Costerton et al., 1999; Vogelee et al., 2014).

La capacité à développer des biofilms dans différents milieux et sur n'importe quel type de surface entraîne de nombreux problèmes dans le milieu industriel, ainsi que dans le secteur médical (Burmølle et al., 2010). Il est connu qu'aujourd'hui les biofilms sont un problème de santé majeur car la matrice polymère extracellulaire des biofilms microbiens réduit grandement l'efficacité des antibiotiques et des désinfectants (Vogelee et al., 2014). Environ 80 % de la biomasse microbienne mondiale réside sous forme biofilm, dû la protection qu'il confère face aux certains stress tels que les conditions environnementales, ainsi que de l'action des antibiotiques, le système immunitaire, et les désinfectants (Jacques et al., 2010). Les bactéries présentes dans les biofilms peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antimicrobiens que les bactéries planctoniques (Anderson and O'toole, 2008). Ainsi, les bactéries formant le biofilm au niveau du système respiratoire chez les patients atteints de fibrose kystique sont plus résistantes aux

antimicrobiens (Sherrard et al., 2014). De même, dans le cas d'infections des voies urinaires, le risque de récurrence est plus grand si les bactéries responsables de ces infections sont capables de former des biofilms (Tapiainen et al., 2014).

Dans certains contextes, les biofilms peuvent également être utiles à l'homme, par exemple, dans le traitement de l'eau potable, les eaux usées et dans la détoxification des déchets dangereux (Flemming and Wingender, 2010). Cependant, dans la majorité de cas, qu'ils soient constitués ou non de bactéries pathogènes, les biofilms sont fréquemment préjudiciables. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre et de contrôler les mécanismes qui conduisent à la formation de biofilms, soit en raison de leur pertinence pour la santé publique ou pour l'économie.

2.2 La formation de biofilm chez *E. coli*

Au sein de l'espèce *E. coli*, de nombreuses souches ont la capacité à former des biofilms. Pour cette raison, ils ont été étudiés autant dans les souches commensales que les pathogènes, et chez ces dernières, autant dans les InPEC que les ExPEC (Hobley et al., 2015; Laverty et al., 2014; Tremblay et al., 2015). Étant donné la grande diversité génétique trouvée chez les *E. coli*, les gènes et les structures impliqués dans la formation de biofilms peuvent être différents entre les souches. Dans le cas des STEC, la formation de biofilms dépend plus de la souche que du sérotype (Vogeleer et al., 2014; Vogeleer et al., 2015). Une des explications possibles est la présence de polymorphismes d'un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphism* ou SNPs), qui mènent à des codons d'arrêt prématurés dans les gènes codant pour les adhésines ou pour RpoS, le facteur sigma en phase stationnaire qui est important pour la formation et la régulation du biofilm (Zhang et al., 2006).

2.3 Les étapes de biofilm chez *E. coli*

Les biofilms se développent généralement dans cinq étapes: le contact initial, l'attachement irréversible, la formation de microcolonies, la maturation du biofilm et sa dispersion.

Pendant le premier contact les bactéries planctoniques adhèrent à la surface à coloniser. Une fois l'adhésion réussie, les cellules s'agrègent médiées par la production des adhésines qui

interviennent dans un attachement irréversible, ainsi que dans la formation de microcolonies. Également, les bactéries excrètent des substances polymères pour former la matrice extracellulaire. Alors que le biofilm est formé, celui-ci mûrit et les cellules forment des grappes multicouches en formant agrégats ou microcolonies, pour passer ensuite à la croissance tridimensionnelle et une maturation ultérieure. Finalement, le biofilm atteint une masse critique, et le détachement et la dispersion des bactéries planctoniques se produisent, pour coloniser de nouvelles surfaces (**Figure 2**) (Gilmore, 2011; Harrison et al., 2005; Jacques et al., 2010).

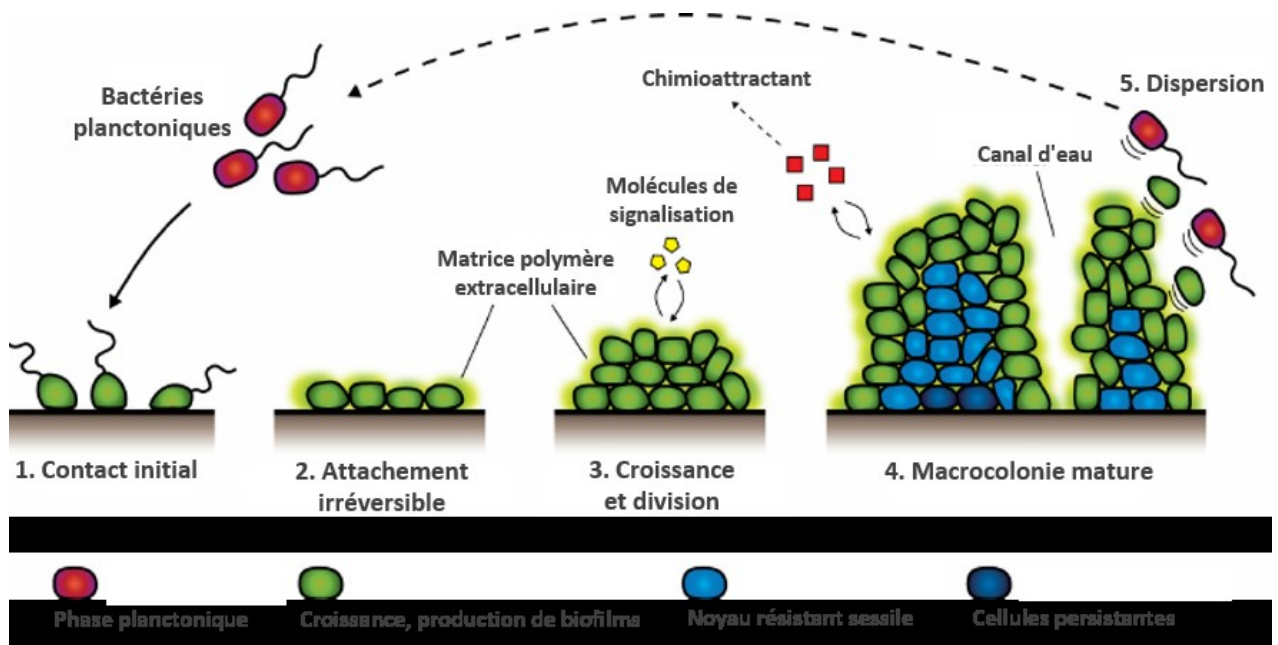


Figure 2. Étapes de la formation de biofilm. 1). Adhésion de bactéries planctoniques à une surface. 2). Agrégation et fixation irréversible des bactéries. Production de la matrice extracellulaire. 3). Croissance et division des bactéries sessiles pour la formation de microcolonies. 4). Maturation du biofilm. Diversité phénotypique au sein de la macrocolonie. 5). Dispersion de biofilm. Induction de facteurs de désassemblage et retour à la vie planctonique. Modifié de: (Gilmore, 2011).

2.3.1 L'adhésion aux surfaces, et la formation de microcolonies et macrocolonies

Le premier contact réversible des *E. coli* à la surface à coloniser est influencé par différents facteurs environnementaux tels que la température, le pH, ainsi que de l'équilibre des forces d'attraction et de répulsions électrostatiques entre les bactéries et la surface ciblée (Donlan,

2002; Vogeleer et al., 2014). Dans cette espèce bactérienne, les flagelles jouent un rôle important lors de l'étape initiale (Danese, Pratt, Dove, et al., 2000; Pratt and Kolter, 1998). Cependant, la présence de ces organelles de surface n'est pas une exigence absolue et les bactéries non mobiles peuvent toujours former des biofilms dans certaines conditions comme observé pour *E. coli* K-12 (Pratt and Kolter, 1998), ou grâce à l'expression de certains facteurs d'adhésion (Donlan, 2002; Reisner et al., 2003).

Une fois les bactéries attachées à une surface, il se produit une suppression des facteurs de motilité et les cellules commencent à adhérer les unes aux autres. Pour cela, *E. coli* utilise plusieurs appendices de surface, tels que des fimbriae de type 1, les curli et certains autotransporteurs (Klemm and Schembri, 2004), lesquelles ont été déjà associés également à la formation de biofilms dans les STEC (McWilliams and Torres, 2014).

2.3.1.1 Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 constituent le groupe d'adhésines le plus commun chez *E. coli*, présents dans environ 80% des souches (Klemm and Schembri, 2004). Neuf sont les gènes *fim* impliqués dans l'expression de ces fimbriae, et qui encodent pour des composantes structurales, un système de transport spécifique et des gènes de régulation (Klemm, 1992; Klemm and Christiansen, 1987; Klemm et al., 1985). La protéine FimH, adhésine présente dans l'extrémité des fimbriae de type 1, présente une haute affinité pour les résidus d'oligomannosides qui sont à la surface des cellules eucaryotes (Duguid and Anderson, 1967). C'est pourquoi le test d'agglutination à la levure peut révéler la présence de fimbriae type 1 chez les bactéries car celles-ci n'agglutineront plus la levure en présence de mannose exogène qui va compétitionner avec les récepteurs de la levure. Ces bactéries agglutinent la levure de façon mannose-sensible, ce qui indique qu'elles produisent des fimbriae de type 1. L'adhésine FimH favorise également l'autoagrégation des bactéries (Schembri et al., 2001).

Les fimbriae de type 1 représentent un des facteurs de virulence les plus importants des *E. coli* pathogènes comme c'est le cas des UPEC, et ces structures jouent également un rôle important lors de la formation de biofilm (Reisner et al., 2014; Stærk et al., 2015).

2.3.1.2 Les autotransporteurs

Lors de l'étape de formation de microcolonies des bactéries, l'interaction cellule-cellule pour former des agrégats est également médiée par des adhésines connus comme autotransporteurs (AT). Les protéines AT représentent le groupe le plus important de protéines sécrétées par la voie de sécrétion de type V, qui est la plus répandue pour le transport de molécules à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Wells et al., 2010). Les AT ont couramment une séquence signal N-terminale, un domaine passager α (qui code souvent une fonction de virulence et est ancré à la surface de la cellule ou libérée dans l'environnement externe), et un domaine de translocation β , qui réside dans la membrane externe (Jose et al., 1995). Cependant, il existe certains autotransporteurs tronqués qui sont dépourvus de domaine de translocation, tels que la protéine YcgV chez l'EHEC EDL933 (Wells et al., 2010).

Un des membres le plus étudié des AT est l'abondante protéine de membrane externe Antigène 43 (Ag43) présente chez la plupart des *E. coli*, incluant des souches pathogènes (Owen et al., 1996). Le gène *agn43*, précédemment appelé *flu*, code pour la protéine Ag43 qui est formée de deux sous-unités distinctes α et β . La sous-unité β fait partie intégralement de la membrane externe d'*E. coli* et est nécessaire pour la translocation de la sous-unité α à travers cette même membrane. La sous-unité α est présente à la surface de la bactérie, en interaction avec la sous-unité β (Hasman et al., 1999).

L'expression de l'Ag43 peut présenter une variation de phase, dont les cellules d'une population clonale peuvent l'exprimer ou pas (Waldron et al., 2002). Cette variation de phase résulte de la compétition de liaison entre le répresseur OxyR et la méthyltransférase Dam avec la région régulatrice *agn43*, une séquence de quatre nucléotides (GATC) présente dans le promoteur du gène. La méthylation de ces sites supprime la liaison d'OxyR conduisant à un état ON, alors que la suppression de Dam conduit à l'état OFF (Chauhan et al., 2013; Henderson et al., 1997; Waldron et al., 2002).

L'expression de l'Ag43 est beaucoup plus importante chez les bactéries sessiles que chez les bactéries libres (Schembri et al., 2003). Alors, étant donné que l'Ag43 favorise l'adhésion entre

les cellules dans les biofilms (Danese, Pratt, Dove, et al., 2000), la sélection des bactéries en phase active pouvant produire Ag43 est favorisée (Chauhan et al., 2013).

Ils existent d'autres autotransporteurs présents chez *E. coli*, comme c'est le cas de l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I), présente dans plusieurs souches diarrhéiques. Cet AT favorise l'autoagrégation cellulaire via l'interaction AIDA-AIDA et sa participation à la formation de biofilm a également été rapportée (Sherlock et al., 2004). D'autre part, certains ETEC présentent un autotransporteur, TibA, qui, par ses interactions inter-microbiennes, favorise la formation de biofilms (Sherlock et al., 2005). Toutefois, il faut noter que les protéines AIDA-I et TibA, ainsi que d'autres protéines telles que EhaA, EhaB et AatA, étant associées à la surface cellulaire ne jouent pas un rôle uniquement dans l'adhésion et l'agrégation, mais interviennent également dans la pathogénèse (Wells et al., 2010). Ces protéines peuvent favoriser l'adhésion et la colonisation des cellules épithéliales (Benz and Schmidt, 1989, 1992; Henderson and Owen, 1999; Lindenthal and Elsinghorst, 2001; Wells et al., 2008), et TibA peut également favoriser l'invasion (Elsinghorst and Weitz, 1994).

2.3.1.3 Les curli

Les fibres de curli ont été visualisées pour la première fois en 1989 par Normark *et al.* (Olsén et al., 1989). Ils avaient signalé la présence de structures superficielles fibreuses dans les souches d'*Escherichia coli* suspectées de provoquer la mammite bovine, et qui sont maintenant appelées curli. L'ensemble des travaux de différents groupes a révélé que la biogenèse des fibres de curli est le résultat d'une voie complexe et finement régulée, appelée système de sécrétion de type VIII (Bhoite et al., 2019).

Curli sont des fibres de protéines extracellulaires sous forme de fibres amyloïdes ordonnées, riches en feuillets β . Elles se retrouvent chez des bactéries à Gram négatif, notamment *Salmonella* Typhimurium (Collinson et al., 1991; White et al., 2006) et *Escherichia coli* (**Figure 3A**). Leur production varie parmi les espèces et aussi à l'intérieur d'une même espèce (Chapman et al., 2002). Ces fibres sont le produit d'un processus d'auto-assemblage qui dépend de la nucléation et du repliement amyloïde et ceci forme la structure native (**Figure 3B**). L'identification

de ces fibres se fait à l'aide de colorants amyloïdes spécifiques tels que le Congo Red et la Thioflavine T (Collinson et al., 1993; Reichhardt et al., 2015; Zhou et al., 2012).

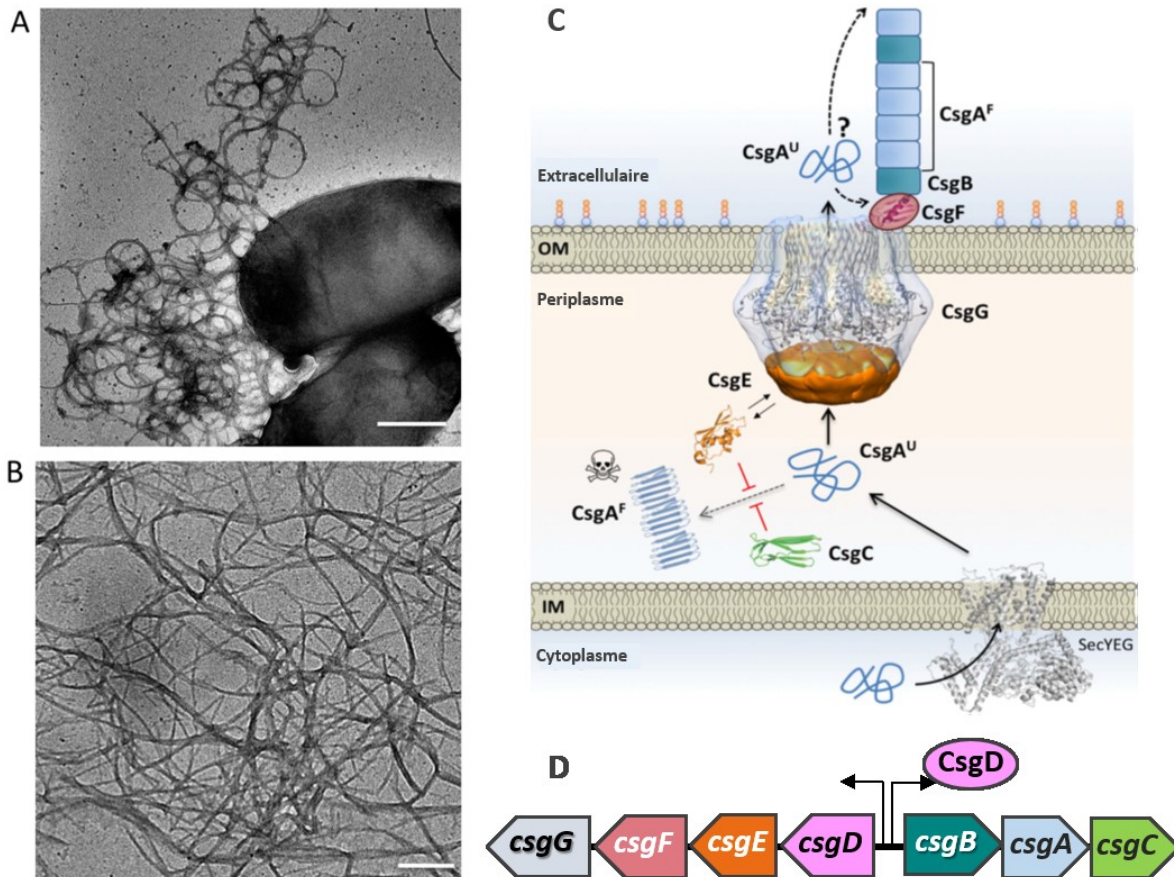


Figure 3. Structure des fibres amyloïdes de curli (A et B). Micrographies électroniques en transmission de cellules individuelles d'*E. coli* produisant des fibres de curli (A) et des fibres analogues à des curli formées in vitro à partir de CsgA (B) purifié. Barres d'échelle: 500 nm et 200 nm, respectivement. **Modèle intégré pour la sécrétion de sous-unités curli. (C). Les opérons divergents *csgDEFG* et *csgBAC* codant pour le système de biogenèse de curli (D).** Photos (A, B) et figure (C) provenant de: EcoSal Plus 2019; doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0037-2018.

Chez *E. coli*, la biogenèse de curli provient de la participation des produits des sept gènes spécifiques de curli (*csg*), disposés sur deux opérons divergents, *csgDEFG* et *csgBAC* (**Figure 3C**) (Hammar et al., 1995). À la surface de la cellule, CsgA en tant que sous-unité principale de curli est transformée dans une fibre amyloïde extracellulaire à l'aide de la sous-unité fibreuse mineure

CsgB (Evans and Chapman, 2014). CsgE, CsgF et CsgG forment la machine d'assemblage et de sécrétion de CsgA et CsgB vers l'extérieur, à travers de la membrane externe (Nenninger et al., 2011; Nenninger et al., 2009; Robinson et al., 2006). La lipoprotéine CsgG agit en tant que porine dans la membrane externe (Goyal et al., 2014; Loferer et al., 1997; Robinson et al., 2006). La protéine CsgE se lie à la porine CsgG et empêche le retour de CsgA dépliée dans le périplasma (Nenninger et al., 2011; Shu et al., 2016). Concernant CsgF, il a été démontré que cette protéine coopère avec la porine CsgG dans sa fonction. Et il semble aussi aider à diriger l'assemblage de CsgA dans une structure amyloïde à la surface de la cellule, ainsi qu'à maintenir CsgB associé à la membrane externe bactérienne (Evans and Chapman, 2014; Nenninger et al., 2009). CsgC de sa part, est une protéine de type chaperone périplasmique qui offre une protection contre la polymérisation incontrôlée de CsgA dans l'espace périplasmique (Evans et al., 2015), probablement en liant et en neutralisant la formation d'intermédiaires précoces d'assemblage et / ou de fibres naissantes (Bhoite et al., 2019). La protéine régulatrice CsgD est un activateur de la transcription de l'opéron *csgBAC*, mais également est le principal régulateur de biofilm chez *E. coli*. CsgD coordonne l'expression de multiples composants de biofilm, notamment le curli (opéron *csgBAC*) et la cellulose (Weber et al., 2006); et en réprimant l'expression des gènes flagellaires (Brombacher et al., 2003; Ogasawara et al., 2011). La séquence promotrice en amont de *csgD* ressemble à un promoteur eucaryote, comprenant une séquence de tête de région non traduite de 139/148 pb de long, avec des séquences régulatrices situées loin en amont et en aval du site d'initiation de la transcription (Hammar et al., 1995; Holmqvist et al., 2013; Ogasawara et al., 2007; Rossi et al., 2018).

Chez *E. coli*, les fibres de curli sont impliquées dans les premières étapes de la formation de biofilm, ce qui permet l'adhésion initiale à une surface, mais également l'agrégation des bactéries (Klemm and Schembri, 2004). Il a été constaté que les biofilms dépendant de la biosynthèse des curli ont tendance à être très stables et difficiles à éliminer. Ceci est dû à la robustesse des fibres amyloïdes (Arita-Morioka et al., 2018) en tant que plates-formes qui fournissent un support adhésif et structurel à la communauté du biofilm.

D'autre part, les curli peuvent aussi participer à la colonisation des cellules hôtes notamment dans le cas des UPEC (Floyd et al., 2015; Nhu et al., 2018) en intervenant dans leur pouvoir

pathogène et en aidant également à l'invasion et à l'activation du système immunitaire (Gophna et al., 2001; Smith et al., 2017). Les bactéries produisant des curli sont plus résistantes à la dessiccation, à la prédation, au stress oxydatif, et à l'action de protéases et d'autres agents antimicrobiens (DePas et al., 2014; Ryu and Beuchat, 2005; Smith et al., 2017; Uhlich et al., 2006).

2.3.2 Formation de la matrice extracellulaire et maturation du biofilm

La matrice extracellulaire est le support par lequel les cellules bactériennes restent attachées à la surface, et facilite les interactions cellule-cellule ainsi que cellule-surface. Cette matrice fournit un support aux cellules de biofilm et confère au biofilm une architecture tridimensionnelle, assurant ainsi un rôle protecteur et structurel (Starkey et al., 2004); Sutherland (2001). C'est une structure très hydratée, constituée également de polymères extracellulaires, de protéines, d'acides nucléiques, de nutriments, de lipides et d'autres métabolites (Flemming and Wingender, 2010). Les lipopolysaccharides et les capsules sont également des facteurs importants dans la formation du biofilm d'*E. coli* (Sharma et al., 2016).

Bien que la production de la matrice extracellulaire commence au cours de la phase de croissance des microcolonies, les bactéries continuent à le produire pendant la phase de maturation du biofilm, afin de le donner la structure tridimensionnelle. Les autotransporteurs (pour l'interaction cellule-cellule) et les substances polymères extracellulaires (SPE) (pour la formation de matrice) sont aussi essentiels pour la maturation des biofilms (Sutherland, 2001). Dans le cas de la matrice des biofilms d'*E. coli*, elle peut être composée de trois SPE différents secrétés: le poly-N-acétylglucosamine (PGA), la cellulose et / ou l'acide colanique (Sharma et al., 2016), ceux qui sont principalement responsables à fournir de la forme structurelle et du support au biofilm.

Les fibres de curli sont également une composante importante de la matrice extracellulaire dans les biofilms matures d'*E. coli*. Ces structures génèrent, dans un biofilm de macrocolonie, une macrostructure extracellulaire qui confère une surface de colonie compacte, une cohésion et une protection cellule-cellule (Serra et al., 2013). Il est aussi connu que l'ADN extracellulaire (Youssef et al. 2019) et le curli de la matrice extracellulaire forment des complexes irréversibles dans lesquels l'ADNe est noyé dans des fibres curli (Gallo et al., 2015). Il est donc protégé de l'action des enzymes DNAase (Collinson et al., 1991; Tursi and Tukul, 2018), ce qui renforce le

biofilm. De même, la forte association entre les structures de curli et cellulose a été rapportée, permettant la formation de réseaux très denses dans la matrice extracellulaire de biofilms d'*E. coli* (Thongsomboon et al., 2018; Zogaj et al., 2001). Ces complexes curli-cellulose stabilisent le biofilm, augmentent l'adhésion de la surface (Serra et al., 2013) et favorisent la résistance au cisaillement du biofilm (Thongsomboon et al., 2018).

2.3.2.1 Le poly-N-acetyl-glucosamine (PGA)

Le PGA est un exopolysaccharide produit par *E. coli*. L'opéron *pgaABCD* code pour les protéines impliquées dans sa production (Wang et al., 2004), y compris la protéine PgaC glycosyltransférase, qui intervient dans la synthèse, l'exportation et la localisation du polymère PGA à la surface des cellules. Le PGA stabilise la structure des biofilms d'*E. coli*, et participe dans l'adhésion et la fixation cellule à cellule sur des surfaces (Agladze et al., 2005).

2.3.2.2 La cellulose

La cellulose est un polymère de glucose avec une liaison β -1,4 glycosidique. Dans les bactéries, la cellulose est synthétisée et excrétée par un complexe cellulose synthase constitué des sous-unités BcsA et BcsB, et insérée dans la membrane interne (Whitney and Howell, 2013). Les protéines impliquées sont codées par deux opérons très différents et arrangés de façon divergente, *yhjR-bcsQABZC* et *bcsEFG* (Le Quéré and Ghigo, 2009; Zogaj et al., 2001). Ce processus est soutenu et régulé par plusieurs protéines accessoires, y compris le régulateur de biofilm CsgD, qui active indirectement la production de cellulose en contrôlant l'expression de la diguanilate cyclase AdrA (YaiC) (DGC) (Uhlich et al., 2013; Weber et al., 2006). De même, l'activité de BcsA est régulée par l'activation allostérique médiée par le second messager ubiquitaire di-GMP cyclique (di-GMPc) (Amikam and Galperin, 2006).

La cellulose est un élément architectural important, avec une distribution spatiale différente au sein du biofilm, et fréquemment liée aux fibres de curli (Serra et al., 2013). Bien que la production de cellulose soit corrélée à la formation de biofilm chez les souches EHEC O157 (Biscola et al., 2011; Lee et al., 2011), il convient de noter que cette production est variable et dépend à la fois de la souche bactérienne et des conditions de l'environnement (Beloin et al., 2008).

2.3.2.3 L'acide colanique

L'acide colanique (AC) est un polymère de glucose, galactose, fucose et acide glucuronique chargé négativement (Hanna et al., 2003). Leur biosynthèse est codée par le groupe de gènes *wca*, qui contrôle la polymérisation, le transport et la modification du polymère (Stevenson et al., 1996). L'AC forme une capsule autour des cellules bactériennes et les protège contre des conditions environnementales spécifiques. Cependant, il a également été démontré qu'il avait un effet inhibiteur sur la formation de biofilm puisqu'il masquait Antigen 43 et AidA (Vogeleer et al., 2014). La synthèse de l'AC est induite dans des biofilms matures (Domka et al., 2007) et il est importante pour leur architecture tridimensionnelle mais pas pour la formation du biofilm (Danese, Pratt and Kolter, 2000; Prigent-Combaret et al., 2000).

Les souches d'*E. coli* O157: H7 produisent de l'acide colanique, mais les données concernant les autres sérotypes de STEC sont limitées (Beloin et al., 2008). Dans ce cas, la production d'AC par les *E. coli* O157: H7 peut servir de barrière de protection pour leur survie dans le tractus gastro-intestinal humain (Mao et al., 2006), ce qui suggère que l'AC pourrait être impliqué dans la formation de biofilm des STEC (Yeh and Chen, 2004).

2.3.3 Communication via *Quorum Sensing* (QS)

Pour la communication entre elles, les cellules bactériennes utilisent une voie de signalisation chimique appelée *Quorum Sensing*, qui permet de coordonner l'expression génique au sein d'une communauté (Walters and Sperandio, 2006), comme c'est le cas dans un biofilm. Au cours du QS, les cellules bactériennes sécrètent des molécules de signalisation similaires aux hormones, nommées autoinducteurs (AI). Ces AI interagissent avec les facteurs de transcription bactérienne afin de réguler l'expression des gènes lorsqu'une concentration seuil critique est atteinte, alors ils régulent positivement la formation et la maturation du biofilm (Sturbelle et al., 2015). Dans un biofilm mature la communication cellule-cellule (QS) continue, et des gradients de nutriments et d'oxygène sont établis. Ces derniers conduisent à l'établissement d'une hétérogénéité fonctionnelle au sein du biofilm, de sorte que des populations de bactéries à différents stades peuvent être retrouvés (Harrison et al., 2005).

Les AI aident les cellules bactériennes du biofilm à sécréter des facteurs de virulence, à moduler la réponse immunitaire de l'hôte et à générer des modifications génétiques. À ce jour, trois types d'AI ont été identifiés: AHL, AI-2 et AI-3. Dans le cas des *E. coli*, ces bactéries produisent, sécrètent et reconnaissent les deux derniers (Vogeleer et al., 2014; Walters and Sperandio, 2006).

2.3.3.1 Les homosérines lactones (AHL)

Les AHL sont les molécules de signal du groupe d'autoinducteurs-1. Même si les *E. coli* ne les produisent pas, au sein d'une communauté bactérienne elles peuvent détecter l'AHL provenant d'autres espèces, médié par le récepteur SdiA, homologue à LuxR (récepteur classique pour l'AHL) (Van Houdt et al., 2006; Walters and Sperandio, 2006). Il a été constaté que, dans la souche K-12, l'activation de SdiA par AHL favorise la formation de biofilms, en augmentant la transcription du gène codant pour la protéine UvrY (Suzuki et al., 2002), qui module à son tour l'expression de fimbriae de type 1. Cependant, un phénomène inverse a été mis en évidence dans la EHEC O157: H7 souche 86-24, où la mutation du gène *sdiA* augmente la production de curli et, par conséquent, la formation de biofilm est accrue (Sharma et al., 2010).

2.3.3.2 Autoinducteur-2

L'AI-2 est un signal non spécifique d'une espèce bactérienne, utilisé à la fois par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Il est synthétisé par la S-ribosylhomocystéine lyase (LuxS)(Schauder et al., 2001). Chez *E. coli*, l'AI-2 est importé à l'intérieur de la cellule via le complexe de transport LsrABCD codé par l'opéron *lsrACDBFG*. D'autre part, l'AI-2 est activé par phosphorylation via la kinase LsrK, et ensuite contrôle divers gènes (DeLisa et al., 2001; Ren et al., 2004; Sperandio et al., 2001). En tant que signal de communication bactérienne, AI-2 est exporté par le transporteur du signal de *Quorum Sensing*, la protéine TqsA (Herzberg et al., 2006).

La stimulation des biofilms par AI-2 dépend principalement d'une régulation de l'activité flagellaire favorisant l'autoagrégation des cellules (Laganenka et al., 2016; Ren et al., 2004). La cascade de régulation induite par l'action de l'AI qui entraîne une augmentation de la biomasse de biofilm, impliquerait aussi le régulateur de motilité de *quorum sensing* MqsR (Barrios et al., 2006). Cette protéine régule de manière transcriptionnelle FlhDC (le régulateur principal des

gènes flagella et motilité), MqsR est donc considérée comme le médiateur entre AI-2 et la motilité (Barrios et al., 2006).

D'autre part, l'AI-2 participe aussi à l'adaptation et à la survie des bactéries dans des conditions de stress environnementales. Il a été confirmé que la corrélation entre le QS médié par l'AI-2 et la croissance bactérienne dans des conditions de stress, ainsi que dans les EHEC O157: H7 l'AI-2 est fortement liée à la réponse au stress osmotique (Park et al., 2017).

2.3.3.3 Autoinducteur-3

L'AI-3 est autre molécule de QS, qui peut être produite par plusieurs souches d'*E. coli* intestinales commensales et pathogènes. Il a été suggéré que cette AI pourrait avoir une structure similaire à celle des hormones de mammifère, l'épinéphrine et norépinéphrine (Rossi et al., 2018; Sperandio et al., 2003). On pense que l'AI-3 et l'épinéphrine / noradrénaline sont reconnus par les mêmes récepteurs, l'un d'entre eux étant le système QseBC à deux composants (Clarke and Sperandio, 2005). L'AI-3 est également détectée par la kinase QseC et peut donc influencer la formation de biofilm via QseB (Yang et al., 2014). Cette molécule est également capable d'activer la transcription des gènes codant pour le système de sécrétion LEE de type III dans les EHEC (Sperandio et al., 2003). Le fait que plusieurs espèces de bactéries synthétisent l'AI-3, suggère un rôle possible dans la communication bactérienne inter-espèces.

2.3.4 Dispersion

Le détachement est la dernière étape du cycle de formation du biofilm et, comme les précédentes, peut être influencée par plusieurs facteurs. À mesure que les biofilms grossissent, les cellules qui se trouvent dans les couches les plus profondes peuvent ne pas avoir accès aux nutriments ou peuvent souffrir de l'accumulation de déchets toxiques. Par conséquent, leur microenvironnement peut devenir défavorable. Ainsi, on pourrait prédire que la dispersion de biofilm devrait être un processus hautement régulé impliquant de nombreux circuits sensoriels (Karatan and Watnick, 2009).

Le détachement peut se produire de manière passive et active. Dans la dispersion passive, la dispersion des cellules de biofilm est provoquée par l'action d'une force externe, telle que le

cisaillement de fluides, l'abrasion (collision de particules solides avec le biofilm), l'action de certains prédateurs et l'intervention humaine (Kaplan, 2010; Lawrence et al., 2002). En ce qui concerne la dispersion active, cela est déclenchée par les bactéries du biofilm eux-mêmes en réponse à des changements environnementaux. On peut citer la privation de nutriments, les sous-produits toxiques, les bactériophages, la stimulation par les phagocytes, l'inhibition du QS, le stress antimicrobien et les niveaux d'oxygène défavorables. Ceux-ci peuvent favoriser la synthèse d'enzymes qui dégradent la matrice de biofilm, ainsi que promouvoir le retour de la motilité, la production de surfactant et la lyse cellulaire (Fleming and Rumbaugh, 2017; Kaplan, 2010; Karatan and Watnick, 2009). De même, la dispersion active est une étape vitale du cycle de vie d'un biofilm qui contribue à la survie bactérienne. En général, la libération de bactéries d'un biofilm existant joue un rôle important dans la transmission des bactéries des réservoirs environnementaux aux hôtes humains et animaux, ainsi que dans l'exacerbation et la propagation de l'infection chez un hôte (Kaplan, 2010).

L'induction de la dispersion de biofilms a été suggérée comme un moyen de lutter contre ceux-ci et il a parfois été recommandé de "nettoyer" les surfaces en appliquant des produits de détachement à proximité du biofilm (Kaplan, 2009). Cependant, peu d'attention a été accordée aux bactéries libérées par le biofilm et à leurs propriétés spécifiques d'une importance particulière surtout dans les cas du milieu clinique. Étant donné leur possible potentiel hautement pathogène, ces bactéries détachées peuvent générer de nouvelles sources d'infection. C'est pourquoi, l'utilisation combinée d'un agent antibactérien en conjonction avec un agent favorisant la dispersion pourrait constituer une bonne alternative anti-biofilm (Chua et al., 2014; Darouiche et al., 2009). Ceci empêcherait la propagation des bactéries vers de nouvelles niches à coloniser.

2.4 Régulation de la formation de biofilms

Les biofilms bactériens, en tant que communautés multicellulaires hautement structurées, deviennent une structure très dynamique, complexe et hautement régulé (Beloin et al., 2008; Serra et al., 2013).

Lors de la formation des biofilms, plusieurs facteurs environnementaux et/ou bactériens vont influencer l'apparition des modifications morphologiques, ainsi que les modifications globales correspondantes de l'expression ou répression des gènes et les changements de la physiologie cellulaire des bactéries. Toutes ces modifications dépendent d'un réseau de régulation comprenant l'induction de la sous-unité sigma (σ) en phase stationnaire de l'ARN polymérase S (RpoS), de l'AMP cyclique (AMPc) et du ppGpp (Serra et al., 2013). De même, le second messager di-cGMP joue un rôle déterminant dans ce réseau et est considéré comme un commutateur important entre les formes mobiles et sessiles de bactéries à Gram négatif (Simm et al., 2004), de sorte que la motilité est inversement régulée avec la formation de biofilms. (Römling, 2012; Römling et al., 2013).

En conséquence, ces changements impliquent la participation de différentes structures bactériennes, telles que les flagelles, la matrice extracellulaire, d'adhésines, de fibres amyloïdes et d'exopolysaccharides. Dans les cas d'*E. coli*, les flagelles sont produits par des cellules pendant la croissance post-exponentielle, lorsque les nutriments deviennent sous-optimaux (Lange and Hengge-Aronis, 1991). Cependant, lorsqu'elles entrent dans la phase stationnaire, les cellules cessent de produire des flagelles, deviennent ovoïdes et génèrent des fibres amyloïdes de curli (Hengge, 2011; Serra et al., 2013).

Ces processus sont contrôlés par un circuit de régulation complexe (**Figure 4**) impliquant le régulateur maître flagellaire FlhDC et la sous-unité σ S (RpoS) de l'ARN polymérase (RNAP) (Hengge, 2011). FlhDC est exprimé dans la phase post-exponentielle du cycle de croissance (Barembuch and Hengge, 2007; Zhao et al., 2007) et contrôle environ 60 à 80 gènes impliqués dans la synthèse et le fonctionnement des flagelles, de la chimiotaxie et des fonctions connexes. Le σ S est le régulateur principal de la phase stationnaire et de la réponse au stress général, qui contrôle l'expression de plus de 500 gènes dans un réseau de régulation extrêmement complexe (Lange and Hengge-Aronis, 1991; Weber et al., 2005).

Les deux régulateurs maîtres FlhDC et σ S reçoivent une régulation majeure de l'AMPc (Botsford and Harman, 1992) et du (p)ppGpp (Magnusson et al., 2005; Potrykus and Cashel, 2008). Les cascades transcriptionnelles contrôlées par FlhDC et par σ S sont inversement coordonnées par la protéine de liaison à l'ADN FliZ (Pesavento and Hengge, 2012) et par le di-GMPc (**Figure 4**)

(Hengge, 2010). Le di-GMPc est produit et dégradé par plusieurs DGCs et par des phosphodiesterases, respectivement. Le di-GMPc, avec le facteur de transcription MirA (Brown et al., 2001) et une RNA polymérase contenant σ^S , s'impliquent dans le contrôle de l'expression de *CsgD*, l'activateur du biofilm dépendant du curli et de la cellulose (Pesavento et al., 2008; Povolotsky and Hengge, 2016; Sommerfeldt et al., 2009; Weber et al., 2006).

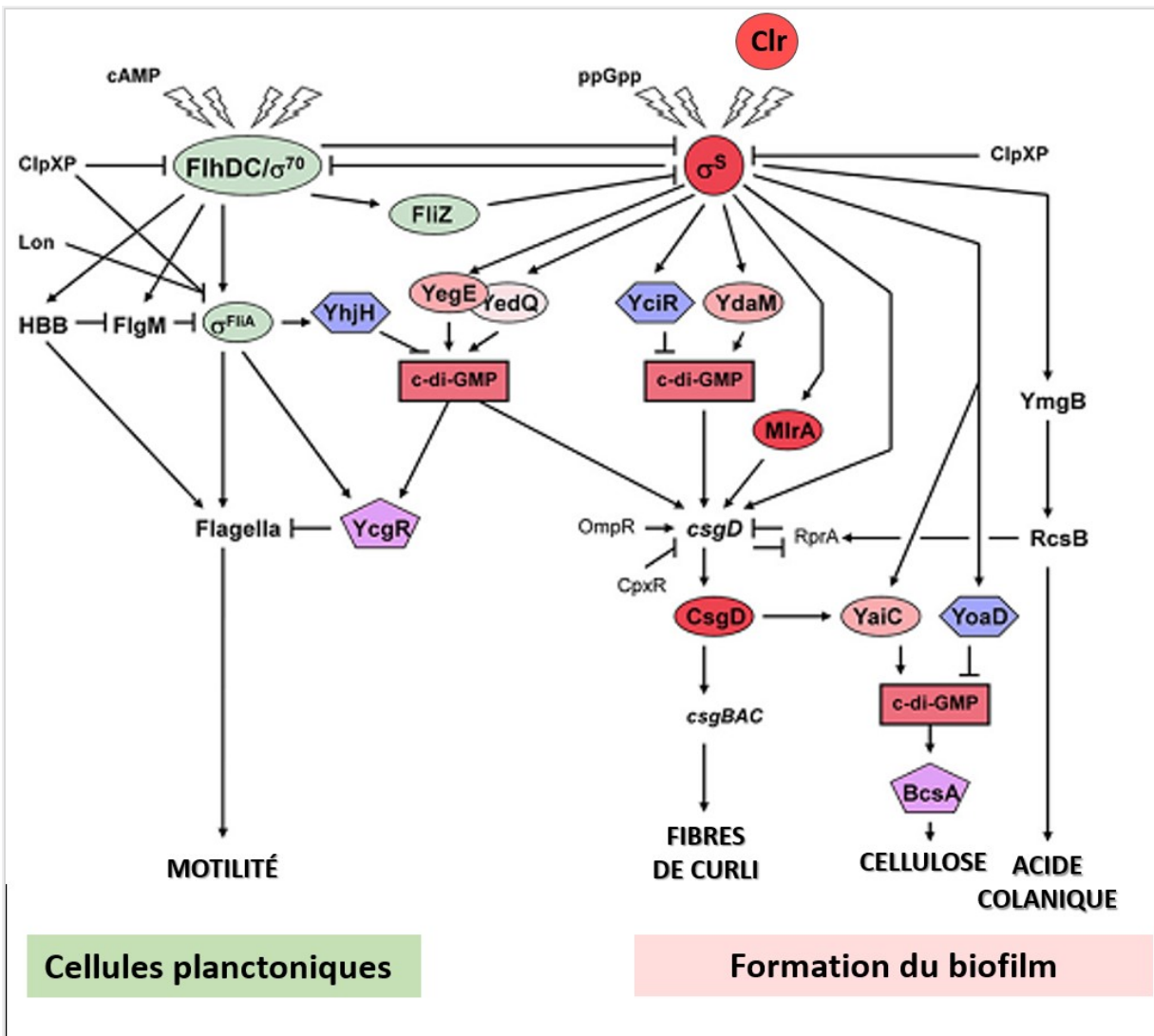


Figure 4. Réseau complexe de régulation de la formation de biofilms dans la majorité des souches d'*E. coli*. Image modifiée de: (Serra et al., 2013).

En plus, des petits ARN (ARNs) peuvent affecter l'expressions des gènes liés à la formation de biofilms. Ils interagissent avec des cibles spécifiques, telles que les protéines, l'ARN ou l'ADN, afin

de remplir leurs fonctions respectives (Mika et al., 2012; Papenfort et al., 2010). La plupart des ARNs fonctionnellement caractérisés se lient par complémentarité des bases à l'ARNm cible, ce qui affecte leur stabilité et / ou l'activité de la traduction (Bak et al., 2015). Environ une centaine d'ARNs ont été confirmés expérimentalement chez *E. coli* (Argaman et al., 2001; Bak et al., 2015; Chen et al., 2002; Raghavan et al., 2011; Rivas et al., 2001; Vogel et al., 2003; Wassarman et al., 2001). Parmi eux, les ARNs ArcZ, DsrA, RprA, McaS, OmrA / OmrB, GcvB et RydC se trouvent plus liés à la régulation de la formation de biofilms, en contrôlant l'expression de *flhDC*, *rpoS* ou *csgD*, (Mika and Hengge, 2013).

En modulant les niveaux de RpoS, les ARNs DsrA, ArcZ et RprA contrôlent indirectement la production de curli et de la cellulose. En outre, RprA, McaS, OmrA, OmrB, GcvB et RydC régulent plus directement l'expression des composants en aval de la « cascade de contrôle de curli » (Boehm and Vogel, 2012; Mika et al., 2012; Mika and Hengge, 2013). Ces ARNs peuvent interagir directement avec l'ARNm de *csgD*, réduisant la production de la protéine CsgD, fortement induite lors de l'entrée en phase stationnaire, et donc dans la couche supérieure des macrocolonies des biofilms à 28°C (Mika and Hengge, 2014). Trois de ces ARNs, RprA et OmrA / OmrB, ciblent également l'ARNm de la DGC et le co-activateur transcriptionnel YdaM, qui, conjointement avec MlrA, activent la transcription de *csgD* (Mika and Hengge, 2014). Ils ont identifié récemment de nouveaux ARNs, tels que CsrB, DicF, GadY, IS118, Och5, SdsR et SgrS, qui ciblent directement ou indirectement les gènes *csgD*, *flhD* et / ou *pgaA* liés au biofilm (Bak et al., 2015). La participation des ARNs à différents stades de la régulation de la formation de biofilms met en évidence la complexité des voies métaboliques médiées par ces molécules (Mika and Hengge, 2014).

2.5 Autoagrégation

Les autoagrégats flottant librement constituent un autre moyen de survie en tant que structure multicellulaire, largement utilisée par les bactéries (tant environnementales que pathogènes), dans de nombreuses conditions des environnements naturelles (Laganenka et al., 2016). Dans l'autoagrégation (aussi appelée autoagglutination), des bactéries du même type forment des amas multicellulaires qui finissent par se déposer au fond des tubes de culture (Trunk et al., 2018).

Il fait souvent partie des premières étapes de la formation de biofilms, en se produisant de deux manières différentes qui peuvent être simultanément en jeu (Trunk et al., 2018). Dans la première, les bactéries planctoniques peuvent soit se fixer à la surface du substrat sous forme de cellules uniques, puis recruter plus de cellules planctoniques via l'agrégation pour former une seule microcolonie (Beloin et al., 2008; Dunne, 2002). Deuxièmement, les cellules planctoniques peuvent aussi s'agréger en suspension, puis se déposer à la surface du substrat (Kragh et al., 2016). Les deux voies peuvent mener à la formation de biofilm (Trunk et al., 2018) (**Figure 5**).

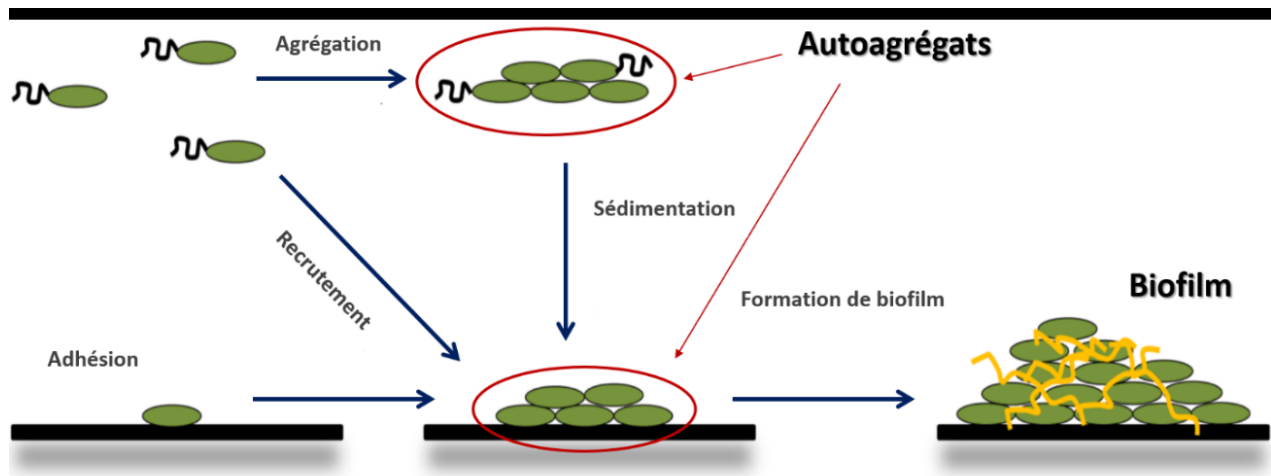


Figure 5. Relation entre l'autoagrégation et la formation de biofilm. Les autoagrégats peuvent être formés sur la surface à coloniser et donner lieu à la microcolonie, ou bien être formés en suspension, puis sédimer à la surface du substrat. Les deux voies peuvent mener à la formation de biofilm. Figure modifié de: (Trunk et al., 2018).

Il est démontré que la croissance en agrégats est avantageuse pour les bactéries car elles sont protégées des stress environnementaux, en particulier dans des conditions telles que le manque de nutriments ou le stress oxydatif (Bossier et al., 1996; Tree et al., 2007). Mais aussi, les autoagrégats et les microcolonies peuvent également jouer un rôle dans la protection contre le système immunitaire de l'hôte (Fexby et al., 2007; Trunk et al., 2018).

L'autoagrégation est généralement induite par des structures de surface auto-reconnaissantes. Chez les *E. coli*, l'Ag43 est un facteur déterminant de l'autoagrégation, où des protéines Ag43 à la surface de deux bactéries adjacentes interagissent, ce qui entraîne la formation de dimères (**Figure 6**) (Hasman et al., 1999; Heras et al., 2014). Bien que l'Ag43 soit principalement impliqué

dans l'autoagrégation de souches non pathogènes en croissance exponentielle, dans le cas des *E. coli* pathogènes, ils peuvent également s'agrégés en utilisant les fimbriae ou de pili (Bieber et al., 1998; Schembri et al., 2001). À des températures de croissance inférieures à 30°C et à la fin de la phase de croissance exponentielle, la formation d'agrégats cellulaires peut également être induite par des interactions de fibres curli (**Figure 6**) (Barnhart and Chapman, 2006).

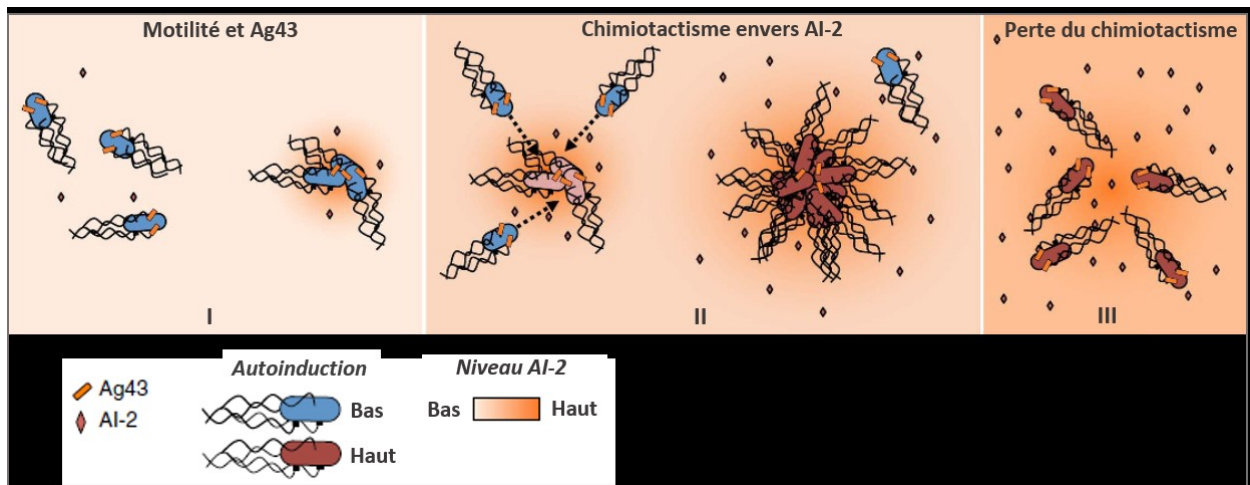


Figure 6. Autoagrégation chez *E. coli*. I) Cela correspond à la formation d'agrégats initiaux par collisions aléatoires de cellules mobiles exprimant Ag43. Ces agrégats initiaux se développent ensuite au cours de la prochaine phase. II) Les gradients d'AI-2 produits par les agrégats servent à attirer des cellules supplémentaires. III) Cela reflète la dispersion des agrégats. Au cours de cette phase, l'augmentation des niveaux d'AI-2 dans la culture entraîne une perte de chimiotactisme due aux niveaux d'AI-2 élevés. Il en résulte une désagrégation progressive ultérieure, car plus de cellules se détachent des agrégats que celles qui s'y lient. Les phases I et II sont similaires pour l'agrégation médiée par les fibres de curli, alors que la phase III est moins prononcée dans ce cas, en raison d'une plus grande stabilité des interactions. Figure modifié de: (Laganenka et al., 2016).

Dans les *E. coli*, la chimiotaxie vis-à-vis de l'AI-2 peut induire une autoagrégation. A ce stade, la mobilité cellulaire est nécessaire pour que les bactéries se recherchent, alors les gradients d'AI-2 induisent donc probablement la régulation de l'activité flagellaire (Barrios et al., 2006; Herzberg et al., 2006; Ren et al., 2004). Ceci favorise l'agrégation de bactéries via Ag43 ou curli, ce qui conduit à la formation de biofilms (Laganenka et al., 2016). Cette autoagrégation n'est pas toujours un simple phénomène passif, mais il peut s'agir d'un processus actif dans lequel les

cellules dépensent de l'énergie pour se déplacer le long de gradients chimioattractants, pour assembler et former des agrégats (Trunk et al., 2018).

III-La formation des biofilms chez les *E. coli* produisant de Shiga-toxines

Compte tenu de l'implication des STEC dans de nombreuses épidémies d'origine alimentaire au cours des trente dernières années, il est suggéré que la capacité à former biofilms des STEC pourrait contribuer à sa persistance dans les chaînes de production alimentaire (Wang et al., 2012). Cela est particulièrement important car STEC peut survivre pendant de longues périodes en dehors de son hôte dans des environnements tels que l'eau, les produits et le sol de la ferme (Vogeleer et al., 2014), ainsi que les milieux industriels. La résistance accrue des STEC poussant dans un biofilm aux désinfectants, sera probablement une source de contamination dans les usines de traitements.

3.1 Persistance des STEC en dehors du réservoir

La contamination de l'environnement et des usines de transformation des aliments par des STEC peut se produire de différentes manières (**Figure 7**). Ces bactéries éliminées dans les excréments, vont contaminer la carcasse et les différentes zones de la ferme (Aslam et al., 2004; Elder et al., 2000). Dans les industries des aliments, les carcasses de bœuf sont contaminées à différentes étapes du processus, ce qui est souvent dû à la formation de biofilms des STEC à la surface de plusieurs équipements associés à l'abattage et à la transformation (Vogeleer et al., 2014).

Les STEC présents dans les matières fécales peuvent contaminer le fumier et, par conséquent, les sols par le fumier ou l'écoulement de fumier épandu sur les champs, ainsi que les eaux souterraines (Gagliardi and Karns, 2000; Solomon et al., 2002; Van Elsas et al., 2011). À ce stade, STEC peut persister et se développer dans des produits frais des champs, tels que la laitue, les épinards et d'autres légumes, en formant des biofilms ou des autoagrégats sur les feuilles. Il a même été suggéré que les bactéries pourraient être intériorisées et survivre dans les tissus végétaux par un mécanisme peu connu (Jeter and Matthyse, 2005; Seo and Frank, 1999; Tyler

and Triplett, 2008). Tout ce qui précède contribue à leur persistance et à leur propagation hors du réservoir, jusqu'au contact avec l'hôte final.

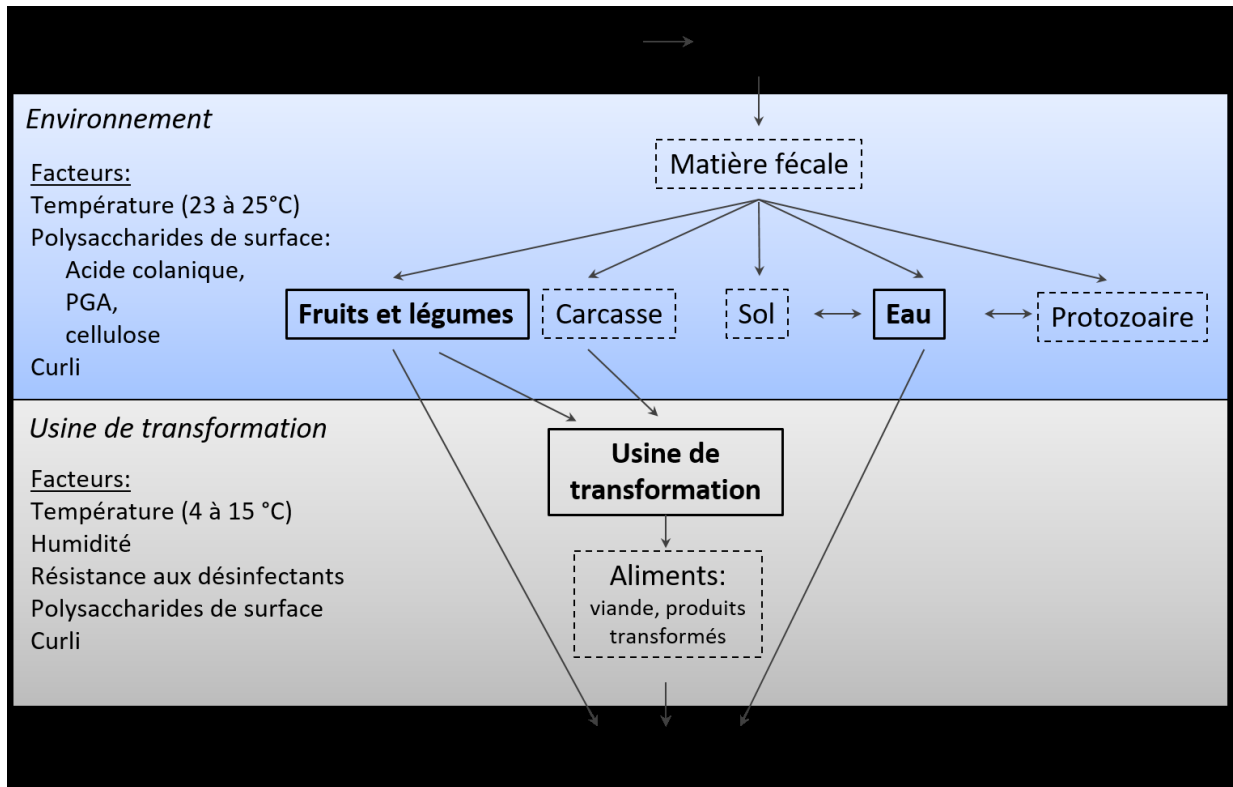


Figure 7. Rôle de la formation de biofilm dans la transmission et la persistance des STEC hors d'un hôte animal. Textes en gras et encadrés par des lignes continues indiquent les environnements dans lesquels les biofilms STEC sont identifiés et participent à leur persistance. Les lignes pointillées indiquent les environnements dans lesquels on suppose que des biofilms STEC sont présents. PGA, poly-N-acétylglucosamine. Modifié de (Vogeleer et al., 2014).

3.2 La capacité de formation de biofilms au sein des STEC

Différents mécanismes régulant la production de facteurs associés à la formation de biofilms dans les STEC ont été rapportés. Par ceux-ci les souches s'adaptent différemment aux environnements distincts. La coordination cellulaire entre les bactéries au sein du biofilm semble être favorisée par des conditions de croissance non optimales ou même par des stress cellulaires,

et confère une meilleure adaptation aux environnements hostiles et une meilleure protection contre ceux-ci (Tremblay et al., 2015).

La capacité des STEC à former des biofilms a été étudiée dans différentes conditions, en utilisant des isolats représentant des séropathotypes et origines distincts (Biscola et al., 2011; Park and Chen, 2015; Wang et al., 2012). En général, ces études ont montré que la formation de biofilms chez les STEC est hétérogène, et dépend principalement des souches, ainsi que des conditions environnementales, telles que la disponibilité des éléments nutritifs, la température, osmolarité et d'autres (Ryu et al., 2004; Vogeleeer et al., 2015; Wang et al., 2012).

Parmi les STEC, les isolats qui ne sont pas O157 continuent à gagner importance en tant que pathogènes inquiétants (Crim et al., 2015), et ses capacités à former de biofilms se sont révélées être différentes de celles des isolats de O157 (Biscola et al., 2011). Cependant, bien que dans les dernières années les études portant sur les souches non-O157 augmentent (Picozzi et al., 2017; Vogeleeer et al., 2015), le sérotype O157: H7 demeure un sujet d'intérêt notamment la capacité des souches à former des biofilms. Récemment, dans une étude visant la caractérisation des biofilms dans un groupe de STEC d'origine humaine appartenant à différents séropathotypes, il a été observé qu'ils ont formé des biofilms de manière dépendante du séropathotype (Vogeleeer et al., 2015). Spécifiquement, les isolats du séropathotype A ont montré une plus grande capacité à former des biofilms que les isolats du séropathotype B ou C, et à la fois dans les conditions statiques et dynamiques (Vogeleeer et al., 2015). Il a été suggéré que cette capacité des isolats du séropathotype A à former de biofilms accrus pourrait contribuer fortement à leur persistance dans l'environnement et influencer sur leur incidence relative élevée et leur implication fréquente dans les épidémies (Karmali et al., 2003).

Bien que la température et le temps influent sur la formation de biofilm par les isolats de STEC (Ryu et al., 2004), de nombreuses études ont montré également que les STEC peuvent se développer dans un biofilm dans la gamme de température ambiante de 4 à 15°C, dans l'environnement de l'usine de transformation (Dourou et al., 2011; Fouladkhah et al., 2013). Aussi, des études récentes ont découvert que le nombre des STEC O157: H7 pouvait atteindre 5 log CFU / ml dans du jus de bœuf à 4°C sur 72 h, et ces bactéries sont capables de coloniser les

surfaces en contact avec le bœuf à 15°C (température sans heures de production) et à 4°C (température avec heures de production) (Dourou et al., 2011; Fouladkhah et al., 2013).

Les conditions environnementales telles que la température et les conditions de culture peuvent également affecter l'expression des gènes contrôlés par le QS. Par exemple, il a été démontré que les biofilms des *E. coli* O157: H7 produisent de grandes quantités d'AI-2 lorsqu'ils sont cultivés dans du bouillon de porc, du bœuf ou des épinards (Silagyi et al., 2009). Cela suggère qu'il est possible pour QS de promouvoir le développement de biofilms, par exemple, dans l'environnement des usines de traitement de la viande.

Par ailleurs, le développement de stratégies d'adaptation permet de trouver des souches STEC dans le cadre de biofilms, qui ne le forment pas dans des conditions normales. Certaines souches d'*E. coli* O157: H7 qui ne forment pas de biofilms peuvent être intégrées à des biofilms préétablis formés par d'autres souches d'*E. coli* (Uhlich et al., 2010). Par conséquent, il est probable que les STEC puissent être intégrés à des biofilms préexistants. Également, les biofilms d'espèces mixtes présentent un intérêt particulier car ils constituent un environnement propice aux échanges génétiques entre bactéries (Maal-Bared et al., 2013). De même, dans les biofilms la transduction des phages porteurs de *stx* dans les STEC est favorisée (Solheim et al., 2013). Ce transfert est également responsable de la propagation de gènes entre différentes souches de *E. coli*. De tels échanges génétiques pourraient contribuer à l'apparition de nouveaux *E. coli* pathogènes et donner lieu à de nouvelles souches d'épidémies.

3.3 Structures associées aux biofilms chez les STEC

Lors des premières étapes de la formation des biofilms, les EHEC O157: H7 n'utilisent pas les fimbriae de type 1 comme dans le cas d'autres *E. coli* (Roe et al., 2001). Il a été démontré que les EHEC du sérotype A sont incapables d'exprimer ces fimbriae en raison d'une suppression de 16 pb dans la région de commutation régulée du gène *fimA* (Enami et al., 1999; Li et al., 1997; Roe et al., 2001). En revanche, d'autres structures extracellulaires seront déterminantes dans ces souches en tant qu'adhésines. À cet égard, il est connu que les longues fimbriae polaires Lpf2 semblent être impliquées dans l'adhésion des STEC aux surfaces. Certaines études montrent que les isolats EHEC positifs pour *lpf2* formaient significativement plus de biofilm que les isolats

négatifs pour *lpf2*. Également, l'expression du produit de *lpf2* était augmentée dans des conditions similaires à celles utilisées pour la formation de biofilm (Lloyd et al., 2012; Torres et al., 2002) et lors d'une culture à 28°C plutôt qu'à 37°C. Ainsi, il a été suggéré un rôle dans la formation de biofilm pour *Lpf2* chez les STEC. D'autre part, certains autotransporteurs comme *YcgV* chez l'EHEC EDL933 (Wells et al., 2010), intervient dans la formation de biofilm de cette souche, dans des conditions de limitation de phosphate (Vogeleer et al., 2019b). Dans le cas des fibres de curli, leur production chez les EHEC est aussi considérée comme un facteur associé à la persistance des bactéries dans l'environnement, favorisant la formation d'agrégats et de biofilms sur des surfaces abiotiques, mais aussi sur des légumes frais (Lloyd et al., 2012; Van Gerven et al., 2018; White et al., 2011).

En ce qui concerne à la matrice extracellulaire des biofilms chez les STEC, comme pour d'autres souches d'*E. coli*, cela est principalement constituée de protéines, de PGA, de cellulose, d'ADNe et d'acide colanique (Lloyd et al., 2012; Vogeleer et al., 2015).

Plusieurs des gènes et / ou des structures associées à la formation de biofilm dans les STEC ont également été identifiés comme des facteurs importants pour la colonisation des plantes par ces bactéries. Des exemples sont le PGA, la cellulose et l'acide colanique, qui jouent un rôle dans l'union d'*E. coli* O157: H7 aux pousses et segments de racines de tomate (Matthysse et al., 2008). Ces résultats fournissent la preuve que les polysaccharides associés à la matrice de biofilm sont cruciaux pour la liaison des plantes. D'autre part, les fibres de curli améliorent l'adhésion des EHEC O157: H7 aux feuilles d'épinard et, chose intéressante, il a été constaté que cette meilleure adhérence est indépendante de la production de cellulose (Macarisin et al., 2012). En plus, dans le contexte de biofilms mixtes, les fibres de curli confèrent aux *E. coli* O157: H7 un caractère compétitif, vraisemblablement par l'interaction entre les STEC et les microorganismes compétents en biofilm associés aux feuilles d'épinard (Carter et al., 2019).

3.4 Stratégies utilisées pour contrer les biofilms des STEC

Il est connu que les cellules des biofilms des STEC sont plus résistantes aux désinfectants que leurs homologues planctoniques (Wang et al., 2012). De nombreuses études ont porté sur les procédures de nettoyage et de désinfection utilisant des méthodes physiques et chimiques. Cependant, la toxicité des résidus de désinfectant et / ou de la résistance bactérienne accrue à ces réactifs de décontamination est rapportée (Houari and Di Martino, 2007; Marouani-Gadri et al., 2009; Wang et al., 2012). Depuis un certain temps, d'autres molécules, préférablement d'origine naturelle, sont testées afin de déterminer leur effet antibiofilm. En général, on recherche des produits qui présentent une faible toxicité pour l'homme et les animaux, et qui permettent d'affecter différentes structures et / ou mécanismes impliqués dans les biofilms.

Sachant que de nombreuses huiles essentielles ont montré une activité antibiotique contre d'autres agents pathogènes d'origine alimentaire, ce même concept a été utilisé pour contrer les biofilms des EHEC. Certains ont réussi à tuer les souches contenues dans le biofilm, mais la matrice reste attachée à la surface (Perez-Conesa et al., 2011). Alors que les huiles essentielles visent la viabilité cellulaire, le meilleur moyen d'éliminer et de prévenir la reconstitution des biofilms est de dégrader l'EPS qui entoure les bactéries, grâce à un traitement enzymatique (Gibson et al., 1999; Lequette et al., 2010).

Une combinaison d'un agent antimicrobien pour tuer les cellules dans le biofilm et d'un agent capable d'éliminer toute la matrice de biofilm pourrait constituer une solution pour réduire et potentiellement éliminer les biofilms des *E. coli* O157: H7. D'autres stratégies telles que les traitements par des bactériophages des biofilms de ces bactéries ont également été étudiées (Sharma et al., 2005). L'effet de techniques combinées telles que les nettoyants en aérosol (Park et al., 2012), les rayons ultraviolets et la chaleur sèche (Bae et al., 2012) a également été étudié. Des études complémentaires devraient étudier l'effet des molécules d'antibiofilm sur la dispersion des biofilms et se concentrer également sur les biofilms mixtes contenant à la fois des bactéries non pathogènes et des bactéries STEC (Vogeleer et al., 2014).

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article

« Contribution of curli to a strong autoaggregation and biofilm-forming phenotypes in
Escherichia coli O157: H7 »

En préparation

Implication de l'auteur dans cet article

En tant que première auteure de l'article, j'ai rédigé la totalité de l'article. J'ai participé dans la conception du projet, j'ai aussi effectué les expérimentations sur l'expression des gènes à l'étude dans les souches d'intérêt, ainsi que toute la caractérisation phénotypique par différentes méthodologies. Ces expériences forment le cœur de l'article.

Contribution of curli to a strong autoaggregation and biofilm-forming phenotypes in *Escherichia coli* O157: H7

Yaindrys Rodriguez Olivera¹, Philippe Vogeleer¹, Frédérique White², Antony T. Vincent³, Steve J. Charrete⁴ and Josée Harel^{1*}.

*Correspondence: josee.harel@umontreal.ca

Abstract

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157: H7 strains are foodborne human pathogens capable of forming biofilms, allowing their persistence in different environments. Some EHEC O157: H7 strains, including Sakai reference strain, have displayed an ability to autoaggregate and agglutinate yeast in a mannose-resistant manner and this was correlated with a strong biofilm formation capacity. To identify genes involved in this phenotype, a transposon mutant library in Sakai strain was created. Of 5000 mutants, the insertion sites of a pool of twenty-two non-agglutinating and weak-biofilm forming mutants were identified by high-throughput sequencing. *csgB* and *csgG* genes involved in curli biogenesis were highly represented. *csgB* and *csgG* mutants formed less biofilm, displayed non-autoagglutinating phenotypes and lost the ability to agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. In addition, on Congo red plates, mutant colonies displayed a non-curliated (white) phenotype, contrasting with the curliated (red) colonies of Sakai. The complementation of *csgB* and *csgG* mutants with plasmids carrying *csgBAC* and *csgG*, respectively restored the wild-type phenotype. The strong expression of curli genes was related to the Sakai curliated phenotype. Moreover, among twelve O157: H7 isolates, five were Sakai-like strong curli producers, while seven isolates were EDL933-like low curli producers. In addition, *csgA* and *csgB* were significantly over-expressed in Sakai and Sakai-like strains biofilms compared to that of EDL933-like strains. These results suggest that the production of curli extracellular fibers is involved in the autoaggregation and strong biofilm formation phenotype in certain groups of O157: H7 strains. Thus, curli is an interesting target to counteract the persistence of O157: H7 strains in natural and industrial environments.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, EHEC, autoaggregation, biofilm formation, curli fibers.

Background

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are food- and waterborne pathogens causing toxi-infections in humans. Among them, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157: H7 (1) is frequently responsible for sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis, which can lead to clinical complications such as hemorrhagic colitis and sometimes, hemolytic uremic syndrome (HUS) (2). The occurrence of several outbreaks is frequently associated with the consumption of contaminated food products, such as undercooked beef, ground meat, unpasteurized milk, raw vegetables or fruits, or contaminated drinking water (3). In nature, the main STEC reservoir is the intestinal tract of cattle (3). Excreted in feces, STEC spread in the environment by contaminating livestock products. Once in the environment, STEC must adapt its lifestyle to survive and persist in hostile conditions, for example, through the formation of biofilms (4).

Biofilms are microbial communities, enclosed in a self-produced extracellular matrix, that are attached to a biotic or abiotic surface (5, 6). Biofilms are complex structures developed in different stages. The process begins on the first contact of the bacteria with the surface to be colonized, followed by an irreversible attachment and the growth in microcolonies or aggregates. It continues with the 3D-growth and maturation of the biofilm, and ends with the dispersion, promoted by certain environmental factors and/or by fluid shear (7). It is well documented that growth as a biofilm offers protection against the nutrient-limited environment and sanitizers or disinfectants (8-11). Thus, it makes difficult the control of the contamination in production chains, such as water or food processing plants (4). Several extracellular structures involved in biofilm formation, such as curli, cellulose, poly-N-acetyl-glucosamine, and colanic acid, promote plant colonization and adherence to different surfaces often found in meat processing plants (4).

Under stress conditions, bacteria can also form autoaggregates. Autoaggregation in *E. coli* is described as the formation of microscopic cell groups that can lead to macroscopic flocculation and the settlement of cells in static liquid cultures (12). The production of

many adhesins such as type 1 fimbriae, long polar fimbriae, F9 fimbriae, Ag43 and curli has been associated with the formation of autoaggregates, as well as the first stages of the development of biofilms (13-19). It is well established that under many natural environmental conditions, bacteria prefer to exist as multicellular structures, such as surface-attached biofilms or freely floating aggregates (20). Autoaggregation and biofilm formation biological processes are strongly interconnected (21).

In a previous work (22), a subset of *E. coli* O157: H7 clinical isolates, including EHEC strain Sakai, were shown to autoaggregate and agglutinate to yeast in a mannose-resistant manner, and this was positively correlated to form strong biofilm. In this study, we aimed to identify genes responsible for this phenotype using EHEC Sakai reference strain, and to verify the positive association between the identified factor (s) and the increased autoaggregation / biofilm formation capacity of other EHEC O157: H7 clinical strains.

Methods

Bacterial strains and growth conditions.

Bacterial strains and clinical isolates in this study are described in Table 1. All strains were stored at -80°C in LB medium containing 15 % glycerol. The wild-type EHEC O157: H7 Sakai, isolated from a huge outbreak occurred in 1996 in Sakai City, Japan (23) and the EHEC O157: H7 EDL933 were used as reference strains, and a collection of twelve O157: H7 STEC isolates described in a previous work of our group were also studied (22). Strains were grown either at 37°C on solid or liquid lysogeny broth (LB) medium, or in M9 minimal medium (MM) supplemented with 0.4 % glucose (wt/vol) and minerals (1.2 mM MgSO_4 , 2 μM FeCl_3 , 8 μM CaCl_2 , and 16 μM MnCl_2). When required, the growth medium was supplemented with chloramphenicol (Cm) (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamycin (Km) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and/or ampicillin (Amp) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Static biofilm formation assay.

Biofilm formation in the static conditions of 96-well microtiter plates was done as previously described (24), with some modifications. Isolated colonies from LB agar were cultured in fresh LB (5 ml) and incubated at 37°C with shaking (180 rpm). Overnight cultures were diluted 1:100 in fresh M9-0.4 % glucose, and 150 µl of culture dilutions were deposited in triplicate into the microtiter plates (Costar 3370; Corning, NY). After a 24-h incubation at 30°C without shaking, the growth of the planktonic (unattached) cells was measured at OD₆₀₀ with a microplate reader (PowerWave; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). The unattached cells were removed, by washing each well three times with phosphate-buffered saline (PBS 1X). After drying the plates at 37°C for 15 min, the biofilms were stained with crystal violet 0.1 % (wt/vol) at room temperature for 2 min. Once the crystal violet solution was removed, the biofilms were washed three times with PBS 1X and then dried at 37°C for 15 min. Finally, the stain was released with an 80 % vol/vol) ethanol – 20 % (vol/vol) acetone solution and the amount of biofilm was quantified by measuring at OD₅₉₅ with a microplate reader. Wells filled with sterile medium were used as the blank value. Results were expressed as the ratio of biofilm measured at OD₅₉₅ over the growth of the planktonic cells measured at OD₆₀₀ (25). Non parametric Mann-Whitney test (Sakai vs EDL933 comparison) and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons (Sakai vs Tn10 mutants and complemented strains) were performed to calculate *p*-values.

Autoaggregation assays.

Autoaggregation was performed as previously (26) with modifications. Strains and STEC clinical isolates were cultivated overnight in LB media at 37°C, and then diluted 1:100 in M9-Glucose 0.4 % (20 ml). After incubation at 30°C for 24 h without agitation, 1 ml of the upper phase was taken 1 cm below the surface to measure the OD₆₀₀ (OD_{Agg}). Cultures were vortexed for 10 s and OD₆₀₀ total was measured (OD_{tot}). The percentage of autoaggregation was calculated according to the formula: $[(OD_{tot} - OD_{Agg}) / OD_{tot}] \times 100$. Non parametric Mann-Whitney test (Sakai vs EDL933 comparison) and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons (Sakai vs Tn10 mutants and

complemented strains) were performed to calculate p -values. Qualitative autoaggregation tests (volume 1 ml and/or 7 ml) were considered for screening assays.

Transposon mutagenesis in Sakai and screening of Tn10 Sakai mutant library.

With the interest of studying possible genes related to the particular ability of the Sakai strain to autoaggregate and form strong biofilms, the generation of a transposon mutant library of Sakai was performed as previously described (27). Briefly, a donor strain χ 7213 λ pir was used to transfer the plasmid pLOF /Cm with the mini Tn10 Cm transposon in the Sakai strain by conjugation. Tn10 Sakai mutants grown in LB agar supplemented with Cm were subsequently selected. Cm^R independent mutants were screened for the loss of autoaggregation capacity and the decrease in biofilm formation with respect to the wild-type phenotype. Qualitative autoaggregation and biofilm formation assays were performed as described above. Sakai and EDL933 were used as positive and negative controls of autoaggregation, respectively, as well as control strains for biofilm formation.

Identification of mini-Tn10 insertion sites.

Mini-Tn10 insertion sites of Sakai autoaggregation negative and biofilm-decreased mutants were identified by DNA sequencing as previously described (28). Each transposon mutant was cultivated separately in LB media, and 1 ml of 4 to 6 clones were pooled for DNA extractions. Genomic DNA was extracted with Qiagen DNeasy blood and tissue kits and pooled at an equimolar concentration in order to prepare two sequencing libraries using KAPA Hyper Prep kit. The libraries were then sequenced using an Illumina MiSeq apparatus at the Plateforme d'Analyses Génomiques of the Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS, Université Laval). The resulting sequencing reads were mapped on the extremities of the sequence of the Tn10 transposon using bwa version 0.7.12-r1039 (29). The mapped reads were converted to fastq format with SAMtools version 0.1.19-44428cd (29) and the Tn10 transposon sequence was filtered from the reads using cutadapt version 1.10 (30). The resulting filtered reads were mapped using bwa on the genomic sequence of *E. coli* O157: H7 Sakai (GenBank: BA000007.2).

The features about where the reads mapped were found using feature Counts (31), which is included in the package subread version 1.5.0-p3. The presence of the transposon in intergenic regions was investigated using Artemis version 16.0.0 (32).

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Strains were grown as described in previous section in M9-0.4 % Glucose. A dilution 1:100 was done in 40 ml of M9 media and bacteria were inoculated in polystyrene petri dishes 24 h at 30°C, to increase the amount of biofilm cells. Biofilms were washed with PBS 1X and attached cells were recovered with cell scrapers (Sarstedt). RNA was extracted from biofilm cells using Ambion® RiboPure™-Bacteria Kit (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's recommendations (28). The absence of residual DNA in RNA samples was confirmed by PCR with primers targeting *rpoA*. cDNAs, standard curves, and quantitative PCR were performed as previously described (33). Briefly, complementary DNA (cDNA) was synthesized from 10 µg of RNA, using a reverse transcriptase and random hexanucleotide primers. The copy number of each transcript was evaluated in 50 ng of each cDNA sample, using a standard curve. Primers used are listed in Table 2. Results are presented as the ratios between the cDNA copy number of the gene of interest and the cDNA copy number of the housekeeping gene *rrsH*. The results are the mean of three independent biological replicates. Non parametric Mann-Whitney tests were performed to calculate *p*-values.

Identification and complementation of Sakai Tn10 mutants.

csgB and *csgG* Tn10 mutants were identified among pool of mutants by PCR. For this, combinations of primers designed outside the genes of interest (upstream and downstream) and inside the chloramphenicol resistance cassette found in the Tn10 transposon were used. The mutation in the target genes was verified by PCR, using primers within the sequence of interest. Complemented mutants were obtained using the expression plasmid pTrc99A. The ORFs of genes of interest were amplified from the genome of Sakai and then inserted downstream of the isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) inducible pTrc promoter in pTrc99A. As complementation

was observed without induction by IPTG, it was not added to the media. Primers used are listed in Supplementary Table 2.

Mannose-resistant yeast agglutination test.

The ability of strains and isolates to agglutinate to *Saccharomyces cerevisiae* cells in a mannose-resistant (MR) or sensitive way was evaluated as described by Vogeleeer *et al.*, 2015 (22). Briefly, 24-h cultures were prepared at 30°C in 20 ml M9-0.4 % glucose without shaking. An initial bacterial suspension with a concentration of approximately 2×10^{11} CFU/ml in PBS 1X was reduced by two-fold serial dilution in a microtiter plate (Corning, 2797). An equal volume of a commercial yeast suspension in PBS 3 % (wt/vol) (Fleischmann's Active Dry) was added to each well. As well, a yeast (3 % [wt/vol]) + α -D-mannopyranose (5 % [wt/vol]) (Sigma-Aldrich) suspension in PBS 1X was added in other wells with two-fold serial dilution bacterial suspension. After 30 min of incubation at 4°C, yeast agglutination was visualized by agglutination and precipitation of cells in the wells of plate. Yeast agglutination was considered independent of type 1 fimbriae if the presence of α -D-mannopyranose did not inhibit agglutination. The agglutination titer was established as the lowest bacterial dilution at which agglutination was observed. The uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) CFT073 strain that binds yeast in a mannose-dependant way, and EDL933 strain that is not capable to agglutinate the yeast were used as controls. A non parametric Kruskal-Wallis test was performed followed by Dunn's test for multiple comparisons to calculate *p*-values.

Colony morphotype in the presence of Congo red.

To induce and determine curli production, strains were cultured on LB agar (1.5 % [wt/vol]) without salt supplemented with Congo Red (CR) (40 μ g/ml) and Coomassie brilliant blue (20 μ g/ml) at 26°C for 48-72 h, as indicated in previous studies (34, 35). Given the affinity of CR for amyloid structures such as curli, obtaining red colonies was indicative of curli production, whereas white-beige colonies indicated the absence or a very low production of curli.

Results

Curli is involved in the biofilm of EHEC strain Sakai

Our previous work (22) showed a positive correlation between mannose-resistant yeast agglutination and the biofilm formation in six of fourteen O157: H7 strains, including the EHEC Sakai reference strain. We also observed a positive correlation between the ability of those seven strains to autoaggregate and to form strong biofilms (data not shown). Therefore, to identify the possible genes involved in this phenotype, a Tn10 mutant library was generated in Sakai. Approximately 5 000 mutants obtained were screened for the loss of autoaggregation ability and then verified for their decreased capacity to form biofilm. Twenty-two non-agglutinating and non-biofilm-forming mutants were found, and the transposons insertion sites of in a pool of lysates of these Sakai mutants were identified by high-throughput sequencing. The list of genes interrupted by the Tn10 in the Sakai mutants is shown in Table 3. The highly represented genes: *csgG*, *csgB*, *trpB*, *pal*, *clpB* and *tqsA* were selected based on reports showing their contribution in biofilm formation and/or aggregation in *E. coli*, as well as other bacteria species (36-41). Their expression was measured in the 24 h-biofilm cells of Sakai strain and compared to the reference strain EHEC EDL933 that has less ability to form biofilm and is not aggregating (22). In addition, the *csgA* and *csgD* genes belonging to *csg* operons were also included in the study of gene expression. Of all these, the *csgA*, *csgB* and *csgG* genes involved in the biogenesis of curli fibers, but not *csgD* gene coding the major regulator, were significantly ($p < 0.05$) overexpressed in Sakai biofilm cells in comparison with EDL933 (Fig. 1a). Besides, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the expression of *trpB*, *pal*, *clpB* and *tqsA* (Fig. 1b) in the Sakai and EDL933 biofilms.

Sakai presents the phenotype of a strain producing curli

The colony morphotype of Sakai and derivatives *csgB* and *csgG* mutants were analyzed in the presence of Congo red. The Sakai strain displayed a distinctive red colony morphotype, indicative of curli production, whereas the EDL933 strain exhibited a white/beige colony morphotype, suggesting a non-curli producing strain (Fig. 2a). Sakai derivatives *csgB* and *csgG* mutants showed a curli-negative phenotype that was restored as expected in the complemented mutants expressing *csgBAC* and *csgG*. Interestingly, complementation only with *csgBA* did not restore the wild-type curliated phenotype (Fig. 2b).

Curli is involved in the autoaggregating phenotype of Sakai

In contrast with EDL933 strain, Sakai strain exhibited a stronger capacity to form autoaggregates (Fig. 3a), the difference being significant ($p < 0.001$) (Fig. 3b). Sakai Tn10 *csgB* mutant lost the ability to aggregate that was recovered in the complemented strains, being expressed in *trans csgBA* or *csgBAC*, and the aggregation phenotype of mutant *csgG* was restored by expressing in *trans csgG* (Fig. 3c). This indicates that curli fibers are involved in the strong aggregating phenotype of Sakai strain.

Curli is involved in the mannose-resistant yeast agglutination in Sakai

We previously found that the Sakai strain was able to agglutinate to yeast in a mannose-resistant manner (MR), although it did not produce type 1 fimbriae (22). As shown in the Figure 4, the MR agglutination ability of Sakai strain was lost when the curli genes were mutated, and was restored in the respective complemented mutants expressing in *trans csgBA*, *csgBAC* and *csgG*. It is possible that the strong curli-mediated autoaggregation in Sakai causes the yeast to be trapped in bacterial aggregates, resulting in the particular MR yeast agglutinating phenotype.

Curli is an important component in the biofilm formation of Sakai

The relative biofilm values obtained for Sakai and EDL933 strains showed that Sakai produces at least 4-fold more biofilm than EDL933 (Fig. 5a). In addition, whereas Tn10 *csgB* and *csgG* Sakai mutants lost their ability to form biofilm (Fig. 5b), this was restored by *trans*-complementation with plasmids carrying *csgBAC* and *csgG*, respectively confirming an important role of curli production in Sakai biofilm formation ability. The plasmid carrying *csgBA* did not restore the wild-type phenotype.

A subset of isolates O157: H7 shows curli gene expression and curli fiber production associated with the phenotype biofilm-autoaggregation

The contribution of curli in the autoaggregating-biofilm forming phenotypes in a collection of EHEC O157: H7 isolates of clinical importance was tested. A subset of these isolates that had previously shown a positive association with MR yeast agglutination and biofilm capacity (22) were designated as Sakai-like strains, whereas the other subset of the isolates that were less aggregating and weaker biofilm formers were EDL933-like. As with Sakai strain, the Sakai-like isolates exhibited curli-producing colonies (Fig. 6a), and the EDL933-like isolates displayed a less or non-curliated phenotype (Fig. 6b). There was a significant ($p < 0.05$) increase in *csgA* and *csgB* transcription, but not for *csgD* and *csgG*, in the biofilm of Sakai-like strain (AJH-5) compared to the EDL933-like strain (AJH-4) (Fig. 7).

Discussion

In a collection of EHEC clinical isolates, a subgroup of O157: H7 strains including Sakai strain were shown to be able to agglutinate yeast in a MR manner and to form strong biofilms (22). Moreover, Sakai-like strains displayed curliated colony phenotypes on Congo Red plates, in contrast to EDL933-like strains. The *csg* mutants of Sakai strain had lost the ability to agglutinate and form biofilm. Altogether these results indicate that

strong genetic expression and production of curli contributed to the phenotypes of autoaggregation and biofilm formation. This is consistent with the literature which has shown that curli genes play a role in the biofilm formation and/ or aggregation of *E. coli*, as well as other bacterial species (42, 43).

This concurs with the suggestion that curled *E. coli* O157: H7 variants are better fit to environmental conditions, whereas less-curlied *E. coli* O157: H7 are better adapted to the host (42). Indeed high production of curli in certain *E. coli* O157: H7 could be an important factor in the persistence of these bacteria in the environment (42, 43), by providing a greater advantage in these bacteria in the formation of aggregates and the adhesion to abiotic surfaces (44).

Curli is a proteic extracellular structure, in the form of ordered amyloid fibers rich in β -sheets (45-47). It can be found in several enterobacteria such as *E. coli* (46) and *Salmonella* Typhimurium (48, 49). In pathogenic *E. coli* it has been shown that curli fibers play a role in bacterial adhesion to abiotic surfaces (50) which promotes the formation of biofilms as in the case of EHEC. Bacteria producing-curli were shown to be resistant to damage from desiccation, predation, oxidative stress, proteases and other antimicrobial agents (9, 51-53). Thus, the strong production of curli in EHEC might contribute to EHEC persistence in different environments.

Several works have reported the importance of curli among the structures involved in the formation of autoaggregates in *E. coli* (14, 15, 17, 20). High curli producing EHEC strains have an increased ability to aggregate. Curli fibers were reported to be important for autoaggregation and for making strong attachment to abiotic polystyrene and stainless steel surfaces, as well as to fresh fruits and leaves of vegetables such as cabbages, and iceberg and romaine lettuce (4, 20, 54-56).

The formation of autoaggregates is generally an early stage of the formation of more complex cellular structures such as biofilms. It was suggested that the autoaggregation can lead to biofilm formation in two ways, firstly, when planktonic bacteria bind to the substrate surface as individual cells and they then recruit more planktonic cells through

aggregation (via autoinducer-2 gradients) to form a single microcolony (20), or when the planktonic cells are aggregated in suspension, then settle on the substrate surface (21, 57, 58).

In our study, we found that the *csgB* Tn10 mutant *trans*-complementation with *pcsgBA* did not restore the highly curli-producing and biofilm-forming wild phenotype, as it did in the case of *pcsgBAC* (Fig. 2). CsgC is a chaperone-like protein that prevents the formation of CsgA amyloid structures in the periplasmic space of bacteria (36, 44, 45, 59-61). The absence of CsgC can influence the curli fiber structure (59). Interestingly, complementation of Tn10 *csgB* mutant with *pcsgBA* had a significant negative impact on the biofilm formation but not on the MR yeast agglutinating- and the autoaggregation phenotypes (Fig. 5). It is possible that the absence of CsgC in such complemented mutants significantly affects the formation of the curli-dependent biofilm of Sakai. Therefore, a morphological change in curli influences the formation of the mature biofilm structure, in the matrix of which the curli is one of the main components (18, 52).

Biofilms dependent on the biosynthesis of curli are stable and their removal is difficult due to robustness of curli amyloid fibers (62), as scaffolds that provide adhesive and structural support to the community. The contrasted difference observed between Sakai and EDL933 regarding the ability to form biofilms and autoaggregation reflects the involvement of a stronger curli production in the Sakai phenotype. Also, the biofilm and autoaggregation differences between the Sakai-like strain subset and that of EDL933-like strains is an indication of the contribution of curli to these phenotypes. Interestingly, we previously showed by confocal microscopy that curli, eDNA, and cellulose were detected in biofilm matrix of EHEC (22). It was previously shown that the association between curli and cellulose structures favors the formation of dense networks in the extracellular matrix of *E. coli* biofilms (63, 64). It is also possible that strong production of curli in Sakai strain might be responsible for its resistance to DNase treatment as eDNA and curli form irreversible complexes where the eDNA is embedded within the curli fibers (48, 65, 66).

The production of curli is part of a highly regulated and complex pathway in *E. coli* (53). In addition to CsgD regulator, the intergenic region between curli *csgDEFG* and *cgsBAC* divergent operons is submitted to the hierarchical control of different regulators involved in different environmental signals (36, 45, 47, 53, 67-69). The differences in the intergenic region, as well as in some of the proteins involved in the different levels of curli regulation, could explain the differences observed in the expression of the curli genes between the EDL933 and Sakai strains, as well as those observed for different strains of *E. coli* O157: H7 (4, 69-71). It is necessary to decipher the regulatory mechanisms responsible for the overproduction of the curli fibers in certain EHEC strain subsets, in order to know more about the genesis of this phenomenon, which may provide adaptive advantages to these EHEC strains.

This study shows that the strong expression of the curli genes and the production of curli fibers contribute to the strong positive association observed in the autoaggregation-biofilm forming phenotype in a subgroup of Sakai-like strains. This gives them specific survival phenotypes, which can lead to better persistence of strains of the O157: H7 STEC serotype in the environment. Also, our results suggest that curli is an interesting target to counter the formation of EHEC aggregates and biofilms in natural and industrial contaminated environments.

Conclusion

In conclusion, the overexpression of the *csg* genes involved in the biogenesis of extracellular curli fibers in the EHEC Sakai strain could be the cause of an overproduction of curli fibers in Sakai. Such curli production seems to be closely related to the distinct phenotype of autoaggregation and biofilm formation that Sakai displays. Accordingly, this possible overproduction of curli amyloid fibers in a subset of O157: H7 strains (Sakai-like) is also implicated in the increased autoaggregation/ biofilm formation ability they show, which would likely give them specific survival phenotypes.

Additional Files

Abbreviations

STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; EHEC: enterohemorrhagic *E. coli*; UPEC: uropathogenic *E. coli*; HUS: hemolytic uremic syndrome; LB: lysogeny broth; PBS: phosphate-buffered saline; OD: optical density; cDNA: complementary DNA; CR: Congo Red dye; Ag43: antigen 43 autotransporter.

Authors' contributions

The experiments were performed mainly by YRO, with the help of PV and FW. YRO, PV and JH performed the data analysis. ATV and SJC performed the sequencing of the transposon mutant library and participated in the analysis of the results. The study was designed by JH, YRO and PV. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2.

²Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

³Institut National de la Recherche Scientifique « Armand Frapier », Laval, Québec, Canada.

⁴Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Université de Laval, Ville de Québec, Québec, Canada.

Acknowledgements

We thank Mr. Marcos Langlois for the technical support in the photos of the colony morphotype experiments.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was supported by a Discovery grant program of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to JH (#RGPIN-2015-05373), Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) strategic cluster no. RS-170946. YRO is a recipient of a scholarship from the NSERC Collaborative Research and Training Experience Program in Milk Quality; and scholarships from the Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, CRIPA-FQRNT and Saint Hyacinthe - Technopole. PV was a recipient of a scholarship from the FRQNT Québec Wallonie program.

References

1. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(11):4930-40.
2. Etcheverria AI, Padola NLJV. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. 2013;4(5):366-72.
3. Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(4):465-87.
4. Vogeleeer P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2014;5:317.
5. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009;11(7):1034-43.
6. Jacques M, Aragon V, Tremblay YD. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*. 2010;11(2):97-121.
7. Kaplan Já. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*. 2010;89(3):205-18.
8. Ryu JH, Kim H, Frank JF, Beuchat LR. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39(4):359-62.
9. Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(1):247-54.
10. Marouani-Gadri N, Augier G, Carpentier B. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 2009;133(1-2):62-7.
11. Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverria A, et al. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:607258.
12. Hasman H, Chakraborty T, Klemm P. Antigen-43-Mediated Autoaggregation of *Escherichia coli* Is Blocked by Fimbriation. *Journal of bacteriology*. 1999;181(16):4834-41.
13. Schembri MA, Christiansen G, Klemm P. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. 2001;41(6):1419-30.

14. Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, et al. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. 1998;280(5372):2114-8.
15. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. Annu Rev Microbiol. 2006;60:131-47.
16. Römling U, Rohde M, Olsén A, Normark S, Reinköster JJM. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. 2000;36(1):10-23.
17. Römling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. Mol Microbiol. 1998;28(2):249-64.
18. Serra DO, Richter AM, Klauck G, Mika F, Hengge R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. MBio. 2013;4(2):e00103-13.
19. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. Mol Microbiol. 2004;51(3):659-74.
20. Laganenka L, Colin R, Sourjik V. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. Nat Commun. 2016;7:12984.
21. Trunk T, Salah Khalil H, Leo JCJAM. Bacterial autoaggregation. 2018;4(1):140-64.
22. Vogeleer P, Tremblay YDN, Jubelin G, Jacques M, Harel J. Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. Appl Environ Microbiol. 2015;82(5):1448-58.
23. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. 2001;8(1):11-22.
24. Tremblay YD, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2015;81(8):2827-40.
25. Sicard JF, Vogeleer P, Le Bihan G, Rodriguez Olivera Y, Beaudry F, Jacques M, et al. N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*. Gut Pathog. 2018;10:26.
26. Bansal T, Jesudhasan P, Pillai S, Wood TK, Jayaraman AJAm, biotechnology. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. 2008;78(5):811-9.
27. Tascon R, Rodriguez-Ferri E, Gutierrez-Martin C, Rodriguez-Barbosa I, Berche P, Vazquez-Boland JJJob. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. 1993;175(17):5717-22.

28. Vogeleer P, Vincent AT, Chekabab SM, Charette SJ, Novikov A, Caroff M, et al. Regulation of waaH by PhoB during Pi Starvation Promotes Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157: H7. *J Bacteriol.* 2019;201(18).
29. Li H, Durbin RJB. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. 2009;25(14):1754-60.
30. Martin MJEJ. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011;17(1):10-2.
31. Liao Y, Smyth GK, Shi WJB. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. 2013;30(7):923-30.
32. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JAJB. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. 2011;28(4):464-9.
33. Le Bihan G, Sicard J-F, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Gobert AP, Garrivier A, et al. The NAG sensor NagC regulates LEE gene expression and contributes to gut colonization by *Escherichia coli* O157: H7. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2017;7:134.
34. Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, Römling UJJoMM. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. 2005;54(12):1171-82.
35. Zhou Y, Smith DR, Hufnagel DA, Chapman MR. Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli. *Methods Mol Biol.* 2013;966:53-75.
36. Hammar Mr, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology.* 1995;18(4):661-70.
37. Vinés ED, Marolda CL, Balachandran A, Valvano MA. Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *Journal of bacteriology.* 2005;187(10):3359-68.
38. Shimazaki J, Furukawa S, Ogihara H, Morinaga Y. L-Tryptophan prevents *Escherichia coli* biofilm formation and triggers biofilm degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419(4):715-8.
39. Frees D, Chastanet A, Qazi S, Sorensen K, Hill P, Msadek T, et al. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1445-62.
40. Zhao X, Wang Y, Shang Q, Li Y, Hao H, Zhang Y, et al. Collagen-like proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) are required for biofilm formation and adhesion to plant roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PloS one.* 2015;10(2):e0117414.

41. Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J Bacteriol.* 2006;188(2):587-98.
42. Lloyd SJ, Ritchie JM, Torres AG. Fimbriation and curliation in *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Microbes.* 2012;3(3):272-6.
43. White A, Sibley K, Sibley C, Wasmuth J, Schaefer R, Surette M, et al. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(21):7620-32.
44. Van Gerven N, Van der Verren SE, Reiter DM, Remaut H. The role of functional amyloids in bacterial virulence. *Journal of molecular biology.* 2018;430(20):3657-84.
45. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 1989;338(6217):652.
46. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 2002;295(5556):851-5.
47. Evans ML, Chapman MR. Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(8):1551-8.
48. Collinson S, Emödy L, Müller K, Kay W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. *Journal of bacteriology.* 1991;173(15):4773-81.
49. White A, Gibson D, Kim W, Kay W, Surette M. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of bacteriology.* 2006;188(9):3219-27.
50. Jeter C, Matthyse AGJMp-mi. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. 2005;18(11):1235-42.
51. Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2564-72.
52. DePas WH, Syed AK, Sifuentes M, Lee JS, Warshaw D, Saggari V, et al. Biofilm formation protects *Escherichia coli* against killing by *Caenorhabditis elegans* and *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(22):7079-87.
53. Smith DR, Price JE, Burby PE, Blanco LP, Chamberlain J, Chapman MR. The Production of Curli Amyloid Fibers Is Deeply Integrated into the Biology of *Escherichia coli*. *Biomolecules.* 2017;7(4).
54. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, et al. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. 2007;7(1):70.

55. Otzen D, Nielsen PHJC, Sciences ML. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. 2008;65(6):910-27.
56. Patel J, Sharma M, Ravishakar S. Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. J Appl Microbiol. 2011;110(3):737-45.
57. Dunne WMJ. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? 2002;15(2):155-66.
58. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;322:249-89.
59. Gibson D, White A, Rajotte C, Kay WJM. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. 2007;153(4):1131-40.
60. Taylor JD, Zhou Y, Salgado PS, Patwardhan A, McGuffie M, Pape T, et al. Atomic resolution insights into curli fiber biogenesis. 2011;19(9):1307-16.
61. Evans ML, Chorell E, Taylor JD, Åden J, Götheson A, Li F, et al. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. 2015;57(3):445-55.
62. Arita-Morioka KI, Yamanaka K, Mizunoe Y, Tanaka Y, Ogura T, Sugimoto S. Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in *Escherichia coli*. Sci Rep. 2018;8(1):8452.
63. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Molecular microbiology. 2001;39(6):1452-63.
64. Thongsomboon W, Serra DO, Possling A, Hadjineophytou C, Hengge R, Cegelski L. Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. Science. 2018;359(6373):334-8.
65. Gallo PM, Rapsinski GJ, Wilson RP, Oppong GO, Sriram U, Goulian M, et al. Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. Immunity. 2015;42(6):1171-84.
66. Tursi SA, Tukel C. Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. Microbiol Mol Biol Rev. 2018;82(4).
67. Barnhart MM, Lynem J, Chapman MR. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2006;188(14):5212-9.
68. Arnqvist A, Olsén A, Pfeifer J, Russell DG, Normark SJM. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. 1992;6(17):2443-52.

69. Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo J-M, Lazzaroni J-C, Lejeune P, et al. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. 2005;187(6):2038-49.
70. Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, et al. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. J Bacteriol. 2001;183(24):7213-23.
71. Vianney A, Jubelin G, Renault S, Dorel C, Lejeune P, Lazzaroni JC. *Escherichia coli tol* and *rsc* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. Microbiology. 2005;151(Pt 7):2487-97.
72. Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. 1999;150(8):787-96.
73. Perna NT, Plunkett III G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. 2001;409(6819):529.
74. Roland K, Curtiss III R, Sizemore DJAd. 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. 1999:429-41.
75. Amann E, Ochs B, Abel K-JJG. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. 1988;69(2):301-15.

Figures & Tables

Figure 1. Expression of genes of interest in 24 h-biofilm cells of Sakai and EDL933 strains by qRT-PCR. a) *csgA*, *csgB*, *csgD* and *csgG* genes. b) *clpB*, *trpB*, *pal* and *tqsA* genes. Biofilms of both reference strains were obtained in the minimum medium M9-0.4 % Glucose, at 30°C. Results are shown as the ratio of copy number of gene transcript / copy numbers of *rrsH* transcript. Results are the mean values and standard error of four biological experiments. Statistical analyzes were made using non parametric Mann-Whitney test to calculate the *p* values (*p* < 0.05).

Figure 2. Curli fibers production evidenced by the colony morphotypes of Sakai, EDL933, Sakai Tn10 mutants and complemented mutants. a) Sakai and EDL933 reference strains. b) Sakai transposon mutants and complemented mutants. Reference strains and mutants were cultured on LB agar without salt in the presence of Congo red, at 26-28°C, 48 h.

Figure 3. Autoaggregation test of Sakai, EDL933, Sakai Tn10 mutants and complemented mutants. a) Picture showing the difference of autoaggregation phenotype between Sakai and EDL933 strains. Autoaggregation measurement of b) Sakai and EDL933 and c) Sakai mutants and complemented strains. The autoaggregation test was carried out in a minimum medium M9-0.4 % Glucose at 30°C, 24 h. Statistical analyzes were carried out using non parametric Mann-Whitney test to calculate the *p* values (*p* < 0.001) in the analysis of the autoaggregation test between Sakai and EDL933. Non parametric Kruskal-Wallis test following a Dunn's multiple comparison test to calculate *p* values (*p* < 0.0001) in the analysis of the autoaggregation test of Sakai and derivatives mutants and complemented strains. Results are the average for at least three biological replicates.

Figure 4. Yeast agglutination test in the absence and presence of α -D-mannopyranoside in Sakai, transposon mutants and complemented strains. Yeast agglutination was determined with 24 h static culture of isolates grown in M9 supplemented with 0.4 % Glucose. Non parametric Kruskal-Wallis test following a Dunn's multiple comparison test were made to calculate p values ($p < 0.001$). Results are the average for at least three biological replicates.

Figure 5. Biofilm formation test of a) Sakai and EDL933, and b) Sakai Tn10 mutants and complemented mutants. Biofilm formation test was performed in 96-well microplates, MM M9-0.4 % Glucose, at 30°C, 24 h. Non parametric Mann-Whitney test to calculate the p values in the comparison of the biofilm formation between Sakai and EDL933 ($p < 0.001$). Non parametric Kruskal-Wallis test following a Dunn's multiple comparison test to calculate p values of Sakai mutants and complementary strains for the biofilm formation ($p < 0.0001$). Results are the average for at least three biological replicates.

Figure 6. Colonies morphotypes of seropathotype A EHEC O157: H7 strains. Strains were cultured on LB agar without salt - Congo Red, 26-28°C, 48 h. a) Isolates Sakai-like, with positive correlation between autoaggregation - biofilm formation b) Isolates EDL933-like, without correlation autoaggregation - biofilm.

Figure 7. Expression of curli genes in 24 h-biofilm cells, by Sakai-like and EDL933-like strains, was demonstrated using qRT-PCR. Biofilms of both isolates were obtained in the minimum medium M9-0.4 % Glucose, at 30°C. Results are shown as the ratio of copy number of gene transcript / copy numbers of *rrsH* transcript. Results are the mean values and standard error of four biological experiments. Statistical analyzes were made using non parametric Mann-Whitney test to calculate the p values ($p < 0.05$). *csgA*, *csgB*, *csgD* and *cgsG* (curli) genes.

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strains	Characteristics	Origin		References
Sakai	Wild type EHEC O157: H7	Human	Diarrhea, HUS	(72)
EDL933	Wild type EHEC O157: H7	Human	Diarrhea, HUS	(73)
Sakai Δ <i>csgB</i> Tn10	Δ <i>csgB</i> Tn10 Cm ^R			This study
Sakai Δ <i>csgG</i> Tn10	Δ <i>csgG</i> Tn10 Cm ^R			This study
χ 7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 glnV44 fhuA21 lacY1recA1 RP4-2-Tc::Mu λpir ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10</i>			(74)
86-24	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-4	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-5	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-6	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-7	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-8	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-9	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-10	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-11	Clinical isolate O157: H7	Human	Diarrhea	(22)
AJH-12	Clinical isolate O157: H7	Human	HUS	(22)
AJH-13	Clinical isolate O157: H7	Human	HUS	(22)
AJH-14	Clinical isolate O157: H7	Human	HUS	(22)
Plasmids	Characteristics			Source
pGEM [®] -T	Cloning vector			Promega Corp., Madison, WI, USA
pMEG-375	Suicide vector <i>sacRB</i> <i>mobRP4</i> <i>oriR6K</i> ; Cm ^R Amp ^R			Roy Curtiss III, Arizona State University, Tempe, AZ, USA
pTrc99A	expression vector with IPTG inducible <i>lacI</i> promoter; Amp ^R			(75)
<i>pcsgBA</i>	pTrc99A with <i>csgBA</i>			This study
<i>pcsgBA</i>	pTrc99A with <i>csgBAC</i>			This study
<i>pcsgG</i>	pTrc99A with <i>csgG</i>			This study

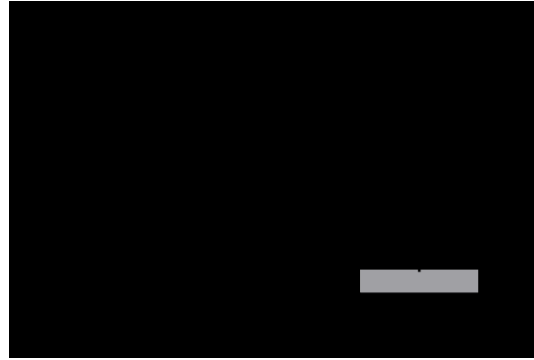
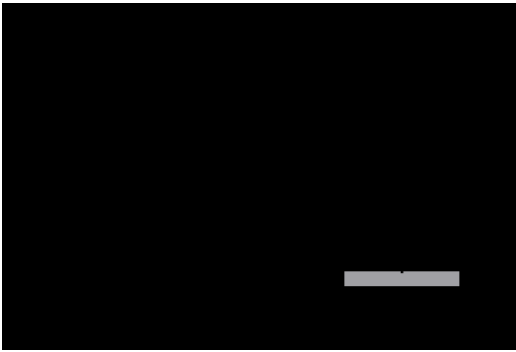
Table 2. List of primers used in this study.

Names	Sequence 5' → 3'	Use
M- <i>rrsH</i> -For	TCTTGACATCCACAGAAC	mRNA quantification
M- <i>rrsH</i> -Rv	CCCAGTCATGAATCACAA	mRNA quantification
q- <i>rrsH</i> -For	ATAAACTGGAGGAAGGTG	mRNA quantification
q- <i>rrsH</i> -Rv	GCATTCTGATCCACGATT	mRNA quantification
M- <i>trpB</i> -For	GGTTTTCGCGCATCATTTTC	mRNA quantification
M- <i>trpB</i> -Rv	CATTGTCCGTGAGTTTCAGC	mRNA quantification
q- <i>trpB</i> -For	GCTTCCAGTGCTTCATCATC	mRNA quantification
q- <i>trpB</i> -Rv	GCACCGCTAAAACATGGTC	mRNA quantification
M- <i>pal</i> -For	GAAAGGGCTGATGATTGCTC	mRNA quantification
M- <i>pal</i> -Rv	GCACGACGGTTTTGGAG	mRNA quantification
q- <i>pal</i> -For	AAGGCGTTTCTGCAGACC	mRNA quantification
q- <i>pal</i> -Rv	CGACGGTTTTGGAGTATGC	mRNA quantification
M- <i>clpB</i> -For	GCTCGCTTCCATCATGC	mRNA quantification
M- <i>clpB</i> -Rv	CAGAAAGTGTTTGTGCCGA	mRNA quantification
q- <i>clpB</i> -For	GCCTGTTGTTCCAGTTGAG	mRNA quantification
q- <i>clpB</i> -Rv	ACGAATTGCACCACCATG	mRNA quantification
M- <i>tqsA</i> -For	AGATCATCGTGCCGTTTA	mRNA quantification
M- <i>tqsA</i> -Rv	CACCAGATAATGAGACACAC	mRNA quantification
q- <i>tqsA</i> -For	AACTCTATTATGACGCCG	mRNA quantification
q- <i>tqsA</i> -Rv	ACTTCGAGCAGCATAAAC	mRNA quantification
M- <i>csgA</i> -For	TTGCAGCAATCGTATTCTC	mRNA quantification
M- <i>csgA</i> -Rv	GTTGTTACCAAAGCCAACC	mRNA quantification
q- <i>csgA</i> -For	GTGGTGGAAGTCTGCACTT	mRNA quantification
q- <i>csgA</i> -Rv	AGTCTTTACCGTTCCACTGA	mRNA quantification
M- <i>csgB</i> -For	TTAACAATACTGGGTGCG	mRNA quantification
M- <i>csgB</i> -Rv	ACTGTCTCTGCACTACAA	mRNA quantification
q- <i>csgB</i> -For	ATCAGGCAGCCATAATTG	mRNA quantification
q- <i>csgB</i> -Rv	CGCAGTATTACCATAAGC	mRNA quantification
M- <i>csgD</i> -For	GCTGGCAATTACAGGAAAAT	mRNA quantification
M- <i>csgD</i> -Rv	CAGGAAACCGCTTGTGTCCG	mRNA quantification
q- <i>csgD</i> -For	TATGCCATGGAGGATCAAGA	mRNA quantification
q- <i>csgD</i> -Rv	GCCGATACGCAGCTTATTCA	mRNA quantification

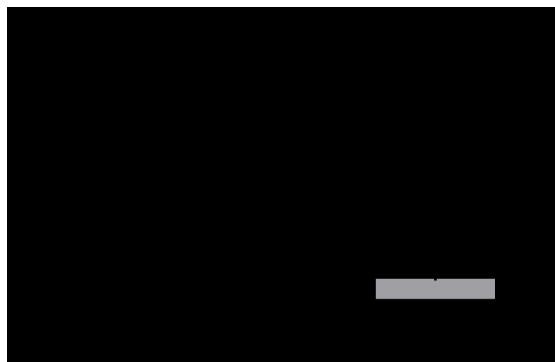
M- <i>csgG</i> -For	GACGGGTAAGATCTTTGT	mRNA quantification
M- <i>csgG</i> -Rv	GGTAGTCAATAAAGCGGA	mRNA quantification
q- <i>csgG</i> -For	GCATTGAAAGATTCTCGC	mRNA quantification
q- <i>csgG</i> -Rv	GCCAGATTTGACATTGCT	mRNA quantification
<i>fcat</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATA	Identification of Sakai Tn10 mutants
<i>rcat</i>	TTGTAATTCATTAAGCATTC	Identification of Sakai Tn10 mutants
<i>csgB</i> ext-For	TAAATGTACGACCAGGTC	Identification of Sakai Δ <i>csgB</i> Tn10
<i>csgB</i> ext-Rv	TAAAACCCCATCGGATT	Identification of Sakai Δ <i>csgB</i> Tn10
<i>csgG</i> ext-For	AACCGATTTTTAAGCCCC	Identification of Sakai Δ <i>csgG</i> Tn10
<i>csgG</i> ext-Rv	CCGGCATTTTTATCTGTC	Identification of Sakai Δ <i>csgG</i> Tn10
SacI- <i>csgBA</i> -For	CGAGCTCATGAAAAACAAATTGTTAT	Δ <i>csgB</i> Tn10 mutant complementation
<i>csgBA</i> -BamHI-Rv	CGGGATCCTTAGTACTGATGAGCGGT	Δ <i>csgB</i> Tn10 mutant complementation
<i>csgBAC</i> -BamHI-Rv	CGGGATCCTTAAGACTTTTCTGAAGAGG	Δ <i>csgB</i> Tn10 mutant complementation
BamHI- <i>csgG</i> -For	GGGATCCTCAGGATTCCGGTGGAACC	Δ <i>csgG</i> Tn10 mutant complementation
<i>csgG</i> -SacI-Rv	CGAGCTCATGCAGCGCTTATTTCTTTTG	Δ <i>csgG</i> Tn10 mutant complementation

Table 3. List of genes interrupted by the Tn10 mini-transposon according to high-throughput sequencing results.

Geneid	Function	No. Hits by sequencing
<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	159
<i>thrA</i>	bifunctional aspartokinase I/homoserine dehydrogenase I	150
<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase	139
<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	132
ECs4759	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/homocysteine S-methyltransferase	128
<i>csgG</i>	protein CsgG	98
<i>trpB</i>	tryptophan synthase subunit beta	76
<i>pal</i>	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	25
<i>tqsA</i>	transporter/quorum signal AI-2 exporter	25
<i>clpB</i>	Heat-shock protein protein disaggregation chaperone	23
<i>ptsG</i>	PTS system glucose-specific transporter subunit IIBC	22
<i>dsbB</i>	disulfide bond formation protein B	18
<i>dsbA</i>	protein disulfide isomerase I	16
<i>csgB</i>	curlin minor subunit	12
<i>rrsC</i>	16S ribosomal RNA	5
ECs1373	hypothetical protein	4
ECs5004	sor-operon regulator	2
<i>rrsB</i>	16S ribosomal RNA	2
<i>rrsG</i>	16S ribosomal RNA	2
<i>bcsA</i>	cellulose synthase catalytic subunit	1
<i>ddl</i>	D-alanyl-alanine synthetase A	1
ECs0143	outer membrane usher protein	1
ECs0214	hypothetical protein	1
ECs0344	dehydrogenase subunit	1
ECs1129	hydrogenase 1 large subunit	1
ECs2332	oxidoreductase	1
ECs2860	glycosyl transferase family protein	1
<i>dsbE</i>	DsbE	1
ECs3227	long-chain fatty acid outer membrane transporter	1
ECs3266	transporter	1
<i>eutE</i>	EutE	1
ECs3434	signal peptidase I	1
ECs3655	hypothetical protein	1
ECs4873	hypothetical protein	1
<i>fimD</i>	protein FimD	1
<i>pssA</i>	phosphatidylserine synthase	1
<i>rrmJ</i>	23S rRNA methyltransferase	1
<i>rrsD</i>	16S ribosomal RNA	1
<i>rrsE</i>	16S ribosomal RNA	1

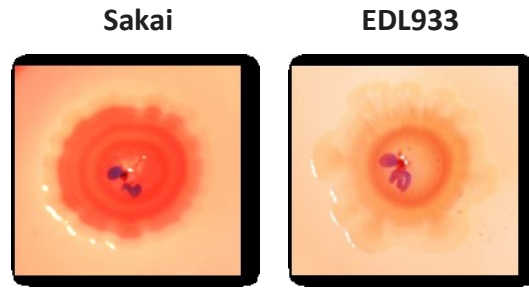


a)

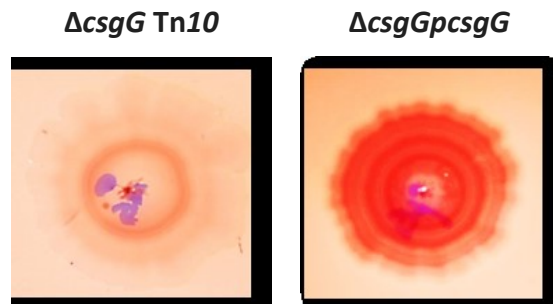
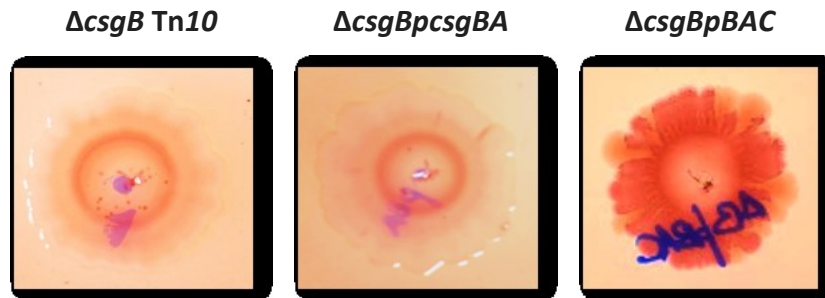


b)

Figure 1.

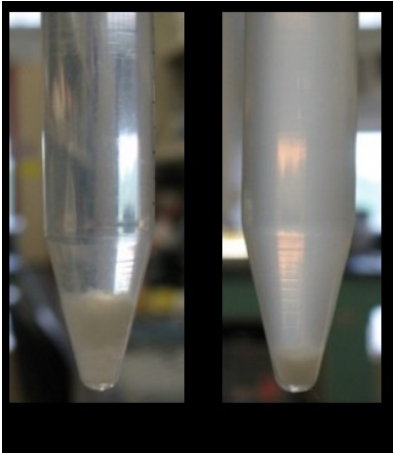


a)



b)

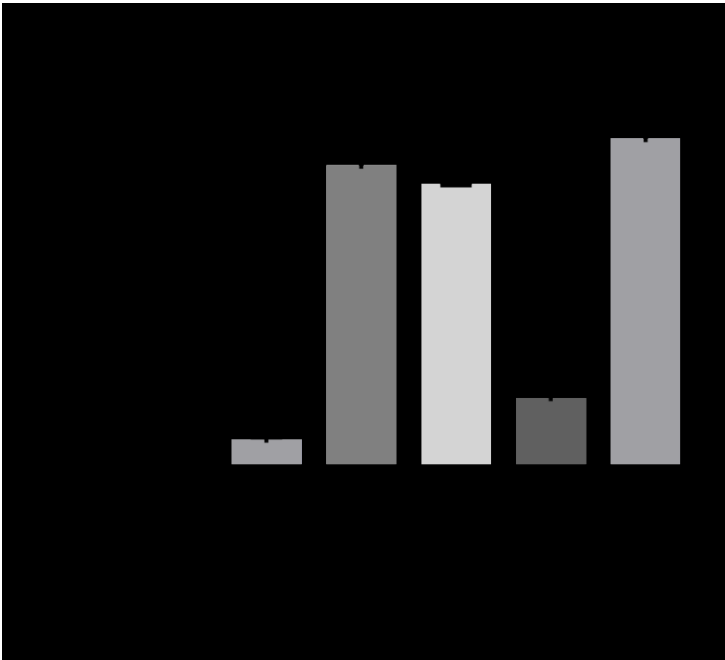
Figure 2.



a)



b)



c)

Figure 3.

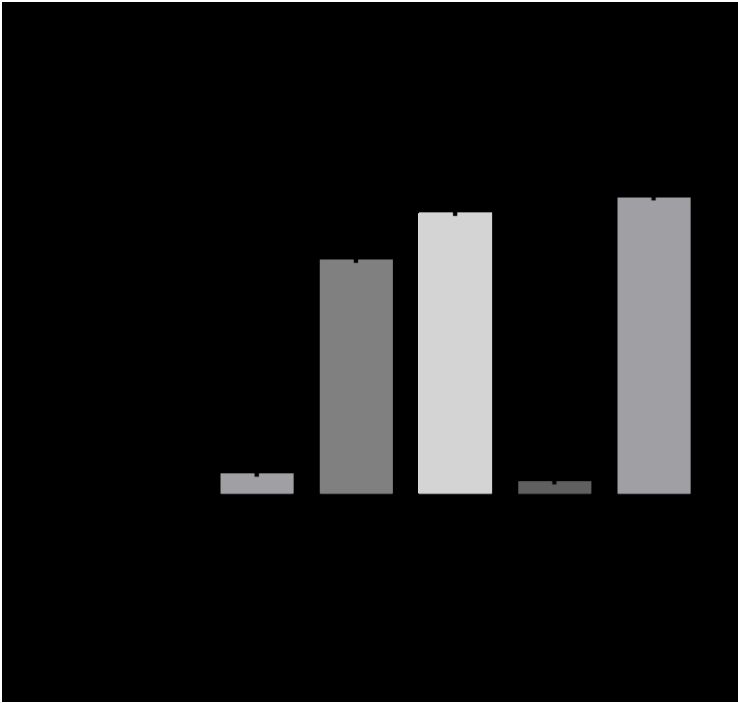
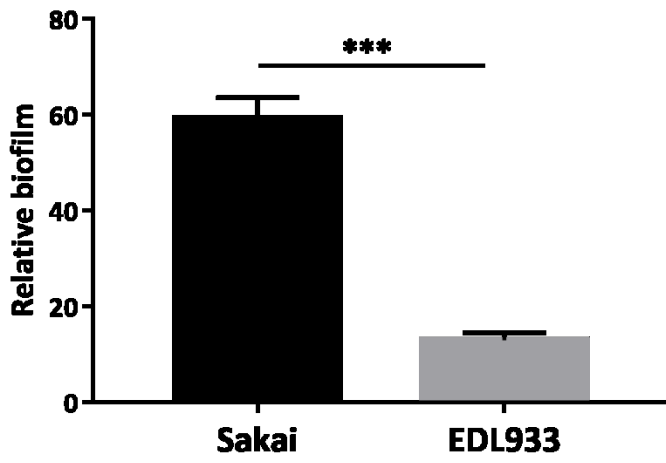
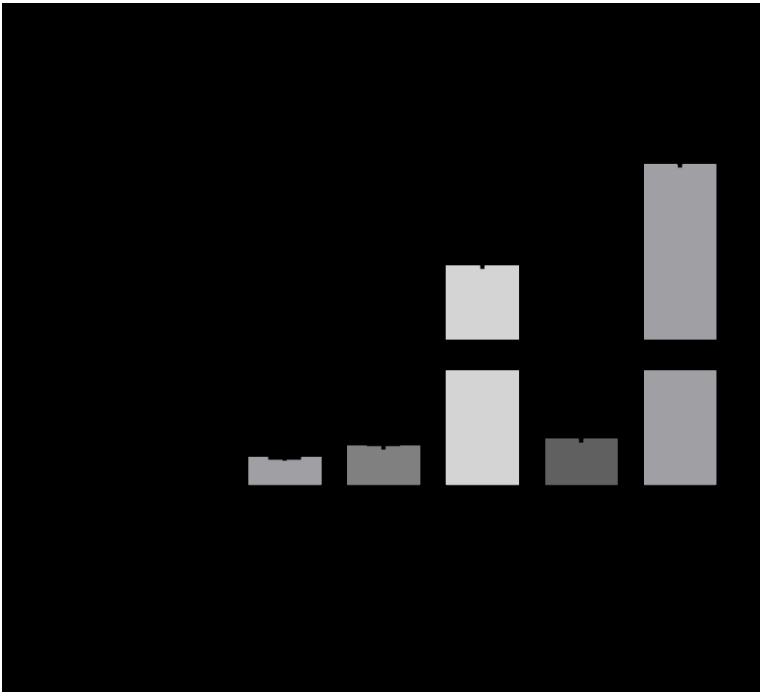


Figure 4.

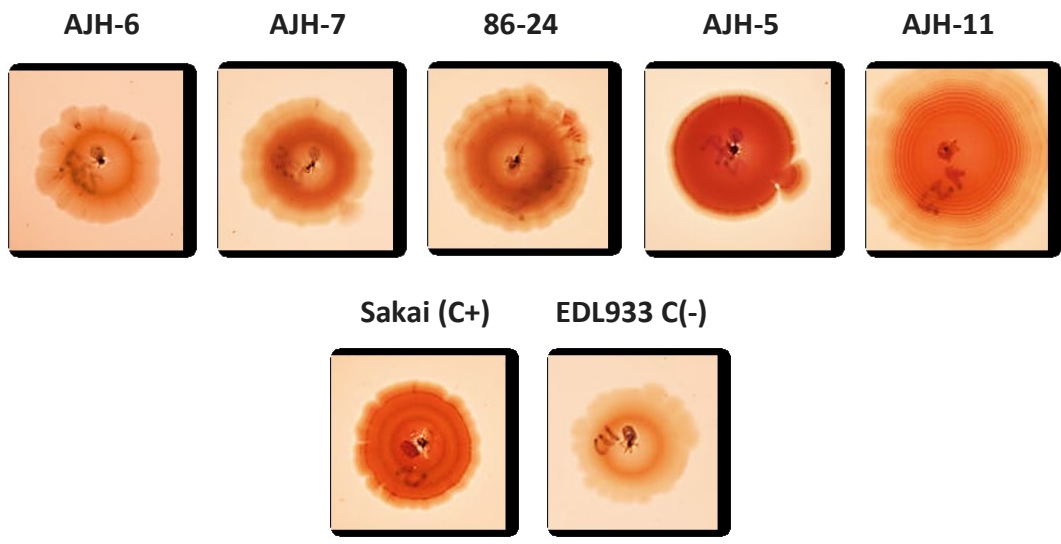


a)

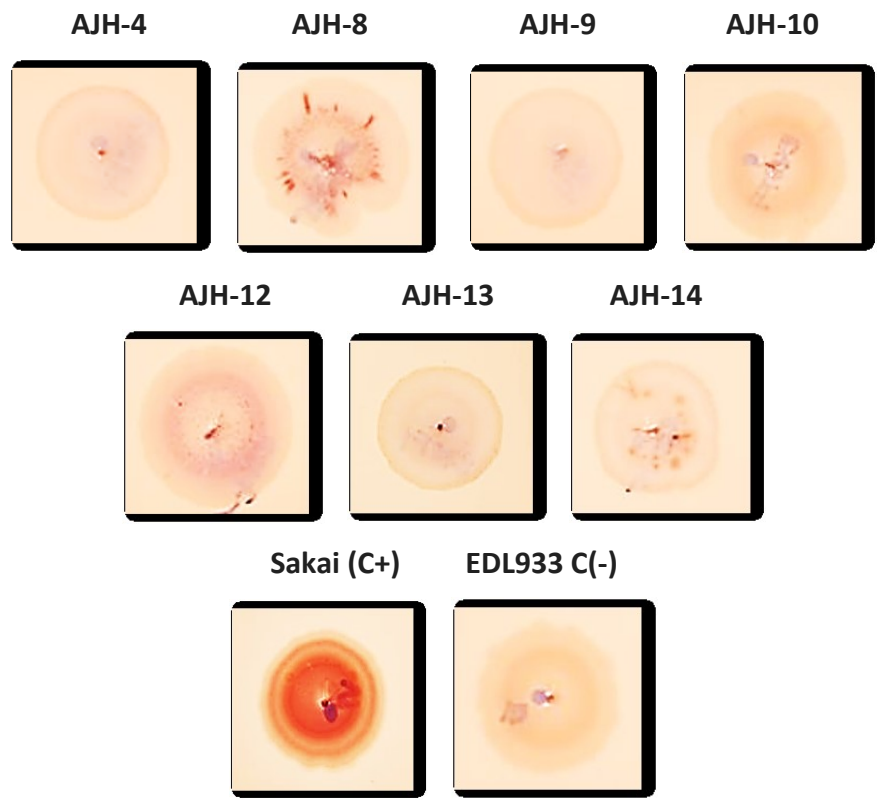


b)

Figure 5.



a)



b)

Figure 6.

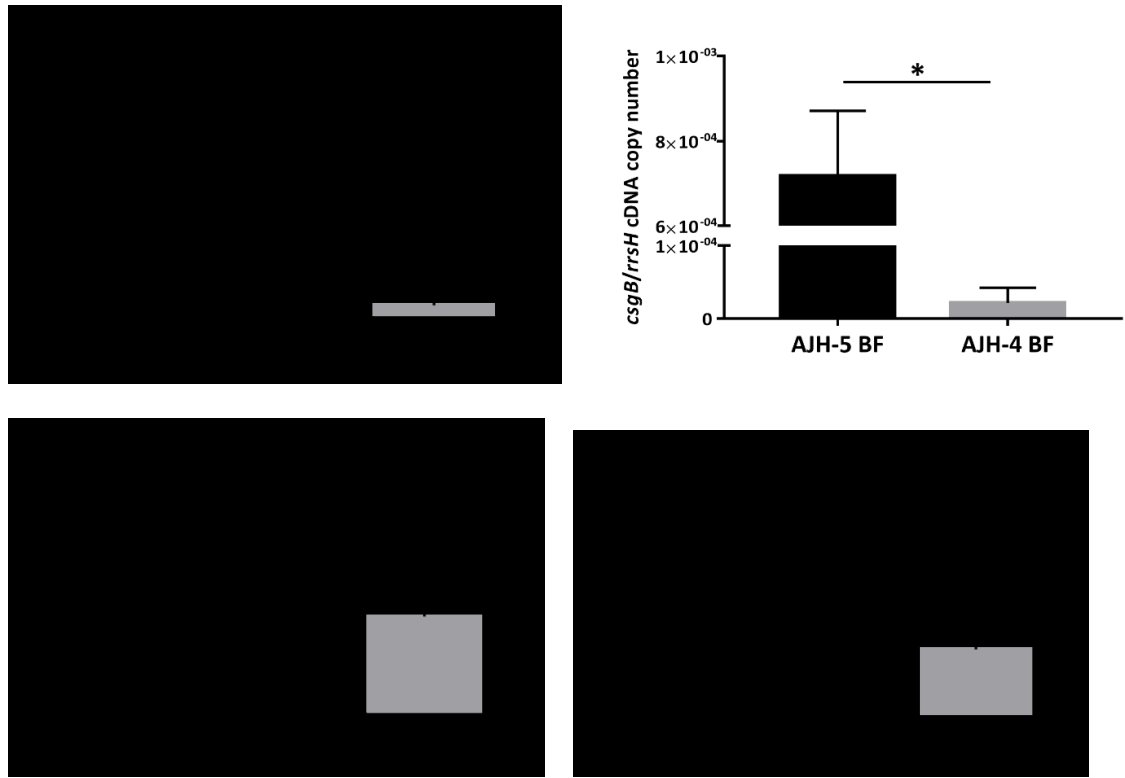


Figure 7.

DISCUSSION

Les fibres de curli contribuent substantiellement à la formation d'autoagrégats et de biofilms chez des souches d'un sous-groupe des EHEC

À l'heure actuelle, les STEC sont des bactéries qui ont une grande capacité d'adaptation aux conditions imposées par les différents milieux où elles peuvent être trouvées, soit le tractus intestinal des animaux réservoirs tels que les bovins, ainsi que chez les hôtes malades, les humains. Mais on les retrouve dans l'environnement tels que dans les matières fécales, l'eau, le sol, les produits des champs, le milieu industriel, etc. La capacité à former des autoagrégats et des biofilms des STEC et notamment des EHEC O157: H7 contribueraient à leur pouvoir de survie et de résistance dans de telles conditions, ce qui garantirait leur transmission (Vogeleer et al., 2014).

Plusieurs études sur la formation de biofilms d'isolats STEC de différents sérotypes et de origines ont rapporté la grande hétérogénéité de ce processus biologique, fortement dépendant des souches ainsi que des conditions utilisées pour l'étudier (Biscola et al., 2011; Park and Chen, 2015; Wang et al., 2012). Un récent travail de notre laboratoire (Vogeleer et al., 2015) a caractérisé les biofilms dans un groupe des STEC d'origine humaine des différents sérotypotypes de A à C (Karmali et al., 2003). Nous avons rapporté que les isolats cliniques O157: H7 de sérotypotype A avaient une plus grande capacité à former des biofilms comparativement avec d'autres souches de sérotypotypes B et C. De plus, il y avait une corrélation positive entre la formation de biofilm et le phénotype d'agglutination à la levure mannose-résistante (MR) ainsi qu'avec la capacité d'autoaggrégation dans un sous-ensemble de souches O157: H7. Parmi toutes, la souche Sakai était le représentant le plus important des phénotypes de corrélation analysés. Dans la présente étude, nous avons voulu d'identifier les gènes impliqués dans ces phénotypes d'intérêt, parmi plusieurs d'autres gènes sélectionnés. Ceci en utilisant la souche Sakai comme modèle, et en criblant une banque de mutants de Sakai pour la perte de leur capacité à autoagglutiner et à faire des biofilms. Parmi les gènes mutés, les gènes *csg* impliqués dans la biogenèse de curli étaient surreprésentés. Par la suite, nous avons observé que le haut taux d'expression des gènes impliqués dans la biogenèse de curli, et de ce fait un haut niveau de production de curli,

contribuait aux phénotypes d'agglutination à la levure MR, d'autoagrégation et de formation de biofilm chez Sakai.

Plusieurs études antérieures ont démontré l'importance du curli parmi les structures extracellulaires impliquées dans la formation accrue d'autoagrégats dans *E. coli* (Jonas et al., 2008; Laganenka et al., 2016; Otzen and Nielsen, 2008), ainsi que leur implication à différents stades lors de la formation de biofilms, y compris chez les STEC/EHEC (Barnhart and Chapman, 2006; Bieber et al., 1998; Chen et al., 2016; Römling et al., 1998). De même, une plus grande résistance aux conditions environnementales hostiles a été observée chez les souches qui produisent ces fibres amyloïdes, dont les propriétés intrinsèques contribuent à la résistance de ces structures (DePas et al., 2014; Ryu and Beuchat, 2005; Smith et al., 2017; Uhlich et al., 2006). On sait que les autoagrégats et les biofilms dépendants de la présence de curli sont stables et leur élimination s'avère inefficace grâce à la robustesse des fibres amyloïdes (Arita-Morioka et al., 2018; Laganenka et al., 2016), qui fournissent un soutien adhésif et structurel d'échafaudage à la communauté.

Notre étude suggère qu'un niveau de production de curli élevé corrèle avec la capacité accrue d'un sous-groupe de souches O157: H7 (*Sakai-like*) à autoagglutiner ainsi qu'à former des biofilms. Ceci réaffirme l'importance du rôle des fibres de curli dans les phénotypes de survie observés, principalement dans des conditions semblables à l'environnement. Nous avons également observé que le sous-groupe de souches EHEC qui ne produit pas de curli (*EDL933-like*) dans les conditions utilisées (température inférieure à 30 degrés, faible osmolarité, etc) forme aussi moins d'autoagrégation et forme moins de biofilm. Le niveau élevé d'expression de gènes codant pour curli chez une souche représentant le groupe *Sakai-like* par rapport à une souche du groupe *EDL933-like* suggère que les phénotypes associés à un fort niveau d'agrégation et de formation élevée de biofilm chez les souches *Sakai-like*, pourraient être principalement dépendants de la production de curli.

La différence de niveau de production de curli entre les souches O157: H7 Sakai et EDL933 peuvent résulter de différences au niveau de la régulation des gènes codant pour curli

L'expression génique de curli chez *E. coli* fait partie d'une voie très complexe et hautement régulée (Smith et al., 2017) puisque plusieurs régulateurs de transcription, ainsi que des facteurs environnementaux tels que la température et l'osmolarité (Barnhart and Chapman, 2006) influent sur l'expression génique (Brombacher et al., 2003; Dorel et al., 1999; Evans and Chapman, 2014; Gerstel and Römling, 2003; Jubelin et al., 2005; Prigent-Combaret et al., 2001; Vianney et al., 2005). Ainsi, par exemple, l'expression du principal régulateur positif CsgD est optimale pendant la phase stationnaire de la croissance bactérienne, et fondamentalement à une température inférieure à 30°C et à une faible concentration en sel (Cimdins et al., 2017). De plus, la région intergénique (RI) entre les opérons *csgDEFG* et *csgBAC* est soumise à un contrôle hiérarchique des différents régulateurs impliqués dans différents signaux environnementaux (Arnqvist et al., 1992; Barnhart et al., 2006; Evans and Chapman, 2014; Hammar et al., 1995; Jubelin et al., 2005; Olsén et al., 1989; Smith et al., 2017).

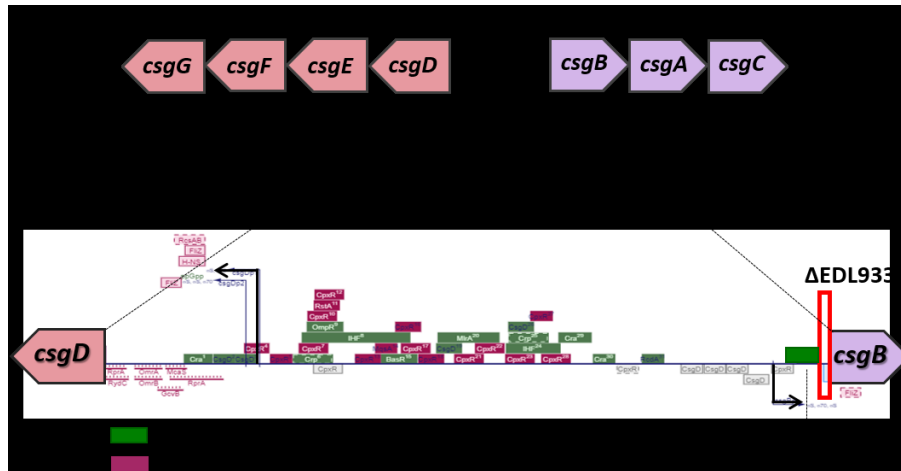
Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas trouvé de mutants Tn10 de la souche Sakai dont les gènes interrompus coderaient pour des régulateurs impliqués dans le phénotype de formation d'autoagrégats et de biofilm. Cependant, il est possible qu'il y ait des différences dans les voies de régulation de la production de curli entre les souches Sakai et EDL933, qui expliquerait les différences significatives trouvées dans l'expression de ces gènes entre les deux. Nous avons procédé à une comparaison analytique *in silico* de séquences géniques impliquées dans la régulation de l'expression des opérons codant pour curli, chez les souches Sakai et EDL933. L'alignement des séquences des régions d'intérêt a été fait, à partir des celles du génome complet déjà publiées dans le GenBank [Sakai (BA000007.3) et EDL933 (CP008957.1) consultées le 1^{er} décembre, 2019], et en utilisant les outils BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) du Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI), pour les séquences de nucléotides (Blastn) et des protéines (Blastp), respectivement.

Tout d'abord, la région couvrant des opérons codant pour curli a été analysée, c'est-à-dire, au niveau la séquence des opérons *DEFG* et *BAC*, et la région comprenant la région intergénique (RI)

et la séquence promotrice. Aucune différence entre les deux souches n'a été trouvée dans les sept cadres de lectures ouverts (*open reading frames* ou ORF) responsables de la biogenèse de curli, ni dans les régions promotrices. Cependant, il est à noter qu'alors que la séquence RI de la souche Sakai contient 753 pb, celle de la souche EDL933 n'est seulement que de 726 pb (Figure 8A et B). Il y a une absence d'une séquence de 27 nucléotides entre le promoteur *csgB* et l'ORF du même gène. Ce site est adjacent à d'un des sites de reconnaissance de l'activateur Cra (Ramseier et al., 1993; Reshamwala and Noronha, 2011).

La protéine Cra (*catabolite repressor/activator*, également connue comme FruR) est un agent régulateur pléiotrope qui influence, de manière indépendante de l'AMPc, des voies majeures liées au métabolisme du carbone et de l'énergie chez les entérobactéries (Saier Jr and Ramseier, 1996), ainsi que la virulence chez les entéropathogènes *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri* et *E. coli* entérohémorragique (EHEC) (Carlson-Banning and Sperandio, 2016; Gore and Payne, 2010; Njoroge et al., 2012). Chez *E. coli*, il a été démontré que Cra active la transcription des opérons curli en activant l'expression de *csgD*. Ceci favoriserait la formation de biofilms par le contrôle de la biosynthèse de curli (Reshamwala and Noronha, 2011). Il existe quatre sites de reconnaissance d'ADN de Cra dans la RI. L'un de ces sites de Cra se trouve 9 nt en amont (Reshamwala and Noronha, 2011) de la séquence de 27 nt manquante chez EDL933. Il serait possible que l'absence de ces nucléotides dans EDL933 affecte la liaison de Cra et conséquemment la transcription des gènes de *csgDEFG* via Cra, ce qui impacterait sur la production de curli. En revanche, cette séquence présente chez Sakai influencerait la transcription et la biosynthèse des fibres de curli, et donc, la possibilité de la formation d'autoagrégats et de biofilms médiés par curli, ainsi que d'autres composants liés aux biofilms et régulés par CsgD, telle que la cellulose.

A)



B)

Alignement des séquences nucléotidiques des régions intergéniques entre les opérons *csgDEFG* et *csgBAC*, chez les souches Sakai et EDL933 (GenBank)

```

Sakai 601 AAAGAAAAATACAACGCGCGGGTGAGTTATTA AAAATATTTCCGCAGACATACTTTCCAT 660
          |||
EDL933 601 AAAGAAAAATACAACGCGCGGGTGAGTTATTA AAAATATTTCCGCAGACATACTTTCCAT 660

Sakai 661 CGTAACGCAGCGTTAACAAAATATAGGTTGCGTTAACACCAAGTTGAAATGATTTAATT 720
          |||
EDL933 661 CGTAACGCAGCGTTAACAAAATATAGGTTGCGTTAACACCAAGTTGAAATGATTTAATT 720

Sakai 721 TCTTAAATGTACGACCAGGTCCAGGGTGACAAC 754
          |||||
EDL933 721 TCTTAA 726
  
```

Figure 8. Régulation de la région intergénique entre les opérons codant pour curli. A) Représentation de la RI et des sites d'action des activateurs et des répresseurs, ainsi que du site de la mutation présente dans EDL933 (perte de 27 nt) par rapport à la séquence de Sakai. B) Alignement par Blastn des régions intergéniques (GenBank) de Sakai et EDL933 (fragment entre les 601-726 nt), et représentation des 27 nt manquantes dans la séquence de la souche EDL933 (caractères en rouge). Figure A modifiée de : *Ecocyc* (<https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=G6546#tab=TU>).

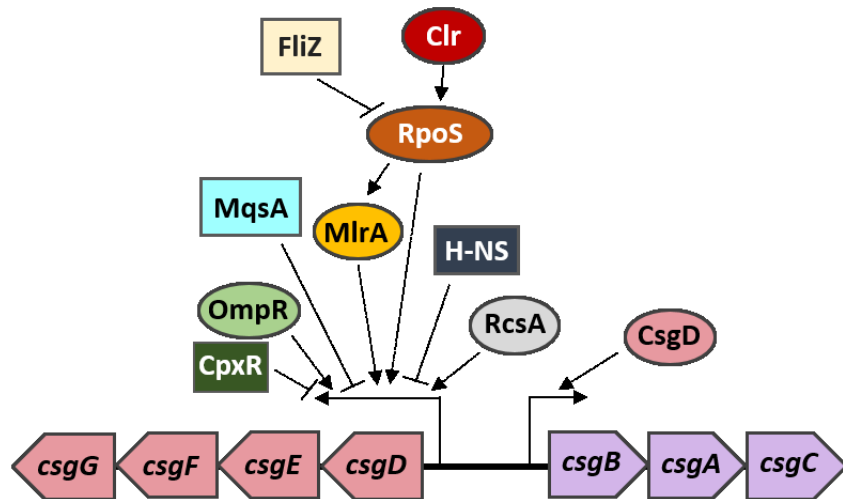


Figure 9. Certaines des protéines régulatrices impliquées, en tant qu'activateurs et / ou répresseurs, dans l'expression des opérons de curli (Evans and Chapman, 2014).

L'analyse des séquences nucléotidiques et d'acides aminés de certains des principaux régulateurs décrits pour les opérons curli indique que pour les régulateurs positifs Clr, OmpR, MlrA, CsgD, Crp et RcdA (directs ou indirects) il n'y a pas de différence (Evans and Chapman, 2014) (**Figure 9**). Par contre, il y a des différences notables au niveau de la séquence du gène *rpoS* et donc celle de la protéine RpoS. En effet, *rpoS* de EDL933 comparé à Sakai est plus court de 39 nt ce qui correspond à une délétion de 14 aa (**Figure 10A et B**).

Le facteur σ^S (RpoS) est le régulateur principal du réseau de régulation qui contrôle l'expression génique de deux composants majeurs du biofilm, soit les fibres de curli et la cellulose. On sait qu'environ 10% des gènes d'*E. coli* sont sous contrôle positif direct ou indirect de σ^S (Weber et al., 2005). La plupart d'entre eux sont impliqués dans la résistance au stress et dans l'adaptation du métabolisme énergétique à une croissance lente ou nulle (Hengge, 2010). Même si l'influence de cette mutation spécifique sur le rôle de RpoS n'a pas été rapportée, il a été bien documenté que des mutations dans *rpoS* atténuent ou inactivent des fonctions dépendantes de ce régulateur, telles que la formation de biofilm dans la plupart des souches qui les possèdent (Uhlich et al., 2013).

A)

Séquences nucléotidiques du gène *rpoS* chez les souches Sakai et EDL933 (GenBank)

Sakai

TTACTCGCGGAACAGCGCTTCGATATTAGCCCCCTGCGTTTGCAGGATTCGCGCAAACGGCGCAGGCCT
TCAACCTGAATCTGGCGAACACGTTTACGGGTGAGGCCAATTTACGACCTACATCTTCCAGTGTGCCC
CTTCGTACCCAGCAAACCGAATCGACGTGCCAGTACTTCACGCTGTTTGGCGTTCAGCTCGAACAGCCA
TTTGACGATGCTCTGCTTCAT**ATCGTCACTTGGTGGTATCTTCCGGACCGTTCTCTTT**TT**CA**TCGGCC
AGGATGTCCAGCAACGCTTTTTCGGAATCACCACCCAGCGGGGTGCTACCGAGGTAATGCGCTCGTTAA
GACGAAGCATAACGGCTGACGTCACTCAACTGGCTTATCCAGTTGCTCTGCGATCTCTTCCGCACTTGGTTC
ATGGTCCAGCTTATGGGACAACCTCACGTGCTGTTCCGAGGTAACGTTTACGCTCCTTACGATGTGAATC
GGCAAACGAATAGTACGGGTTTGGTTCATAATCGCCGTTCAATCGTCTGGCGAATCCACCAGGTTGCGT
ATGTTGAGAAGCGGAAACCACGTTCCGGGTCAAACCTTCTCTACCGCACGGATCAGCCCCAGGTTGCCCTC
TTCGATAAGGTCCAGCAACGCCAGACCACGATTGCCATAACGGCGGGCAATTTTTACCACCAGACGCAAG
TTACTCTCGATCATCCGGCGGCGAGAGGCGACATCTCCACGCAGTGCAGCGCGCAAAAATAAACTTCTT
CTTCCGGCCGTTAACAGTGGTGAATAACCAATCTCACCAGGTAAGCTGAGTCGCGTCCAACACACGCTG
TGTGGCTCCCTGCGATAACAGTTCCTCTTCCGCCAAATCGTTATCACTGGGTTCTCTTCTACTAAGGCC
TTTTCGTCAAAAACCTCAACTCCGTTCTCATCAAATTCGCATCTTCATTTAAATCATGAACCTTCAGCG
TATTCTGACTCAT

EDL933

TTACTCGCGGAACAGCGCTTCGATATTAGCCCCCTGCGTTTGCAGGATTCGCGCAAACGGCGCAGGCCT
TCAACCTGAATCTGGCGAACACGTTTACGGGTGAGGCCAATTTACGACCTACATCTTCCAGTGTGCCC
CTTCGTACCCAGCAAACCGAATCGACGTGCCAGTACTTCACGCTGTTTGGCGTTCAGCTCGAACAGCCA
TTTGACGATGCTCTGCTTCAT-----TT**AA**TCGGCC
AGGATGTCCAGCAACGCTTTTTCGGAATCACCACCCAGCGGGGTGCTACCGAGGTAATGCGCTCGTTAA
GACGAAGCATAACGGCTGACGTCACTCAACTGGCTTATCCAGTTGCTCTGCGATCTCTTCCGCACTTGGTTC
ATGGTCCAGCTTATGGGACAACCTCACGTGCTGTTCCGAGGTAACGTTTACGCTCCTTACGATGTGAATC
GGCAAACGAATAGTACGGGTTTGGTTCATAATCGCCGTTCAATCGTCTGGCGAATCCACCAGGTTGCGT
ATGTTGAGAAGCGGAAACCACGTTCCGGGTCAAACCTTCTCTACCGCACGGATCAGCCCCAGGTTGCCCTC
TTCGATAAGGTCCAGCAACGCCAGACCACGATTGCCATAACGGCGGGCAATTTTTACCACCAGACGCAAG
TTACTCTCGATCATCCGGCGGCGAGAGGCGACATCTCCACGCAGTGCAGCGCGCAAAAATAAACTTCTT
CTTCCGGCCGTTAACAGTGGTGAATAACCAATCTCACCAGGTAAGCTGAGTCGCGTCCAACACACGCTG
TGTGGCTCCCTGCGATAACAGTTCCTCTTCCGCCAAATCGTTATCACTGGGTTCTCTTCTACTAAGGCC
TTTTCGTCAAAAACCTCAACTCCGTTCTCATCAAATTCGCATCTTCATTTAAATCATGAACCTTCAGCG
TATTCTGACTCAT

rpoS Sakai: 993 nt

rpoS EDL933: 954 nt

B)

Alignement des séquences d'acides aminés (aa) de RpoS des souches Sakai et EDL933 (GenBank), à partir de l'aa en position 181 jusqu'à la fin de chaque séquence

```
Sakai 181 TARELSHKLDHEPSAEEIAEQDKPVDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILAD 240
          TARELSHKLDHEPSAEEIAEQDKPVDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILA
EDL933 181 TARELSHKLDHEPSAEEIAEQDKPVDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILA 239

Sakai 241 EKENGPEDTTQDDDMKQSIVKWLFELNAQREVLARRFGLLYEAATLEDVGREIGLTRE 300
          DMKQSIVKWLFELNAQREVLARRFGLLYEAATLEDVGREIGLTRE
EDL933 240 -----DMKQSIVKWLFELNAQREVLARRFGLLYEAATLEDVGREIGLTRE 286

Sakai 301 RVRQIQVEGLRRLREILQTQGLNIEALFRE 330
          RVRQIQVEGLRRLREILQTQGLNIEALFRE
EDL933 287 RVRQIQVEGLRRLREILQTQGLNIEALFRE 316
```

Figure 10. Alignements des séquences (GenBank) du gène *rpoS* (A) et de la protéine RpoS (B), des souches Sakai et EDL933, en utilisant Blastn et Blastp. Les nucléotides ou les acides aminés (selon 9A ou B) qui sont présents dans Sakai et absents dans EDL933 sont en rouge et surlignés en jaune.

Des études précédentes ont aussi documenté que des isolats cliniques EHEC présentent une fréquence élevée de mutations du gène *rpoS*. Celles-ci seraient induites par une exposition à des environnements stressants, ce qui imposerait des barrières supplémentaires à l'expression de curli et réduirait ou supprimerait l'expression chez certaines souches (Uhlich et al., 2014). Cette dernière hypothèse est intéressante car le σ^S RpoS en phase stationnaire est considéré comme un déterminant majeur de la résistance au stress chez *E. coli* (Ferenci, 2003; White et al., 2011). Par conséquent, nous pouvons supposer que les mutations trouvées dans EDL933 pourraient compromettre considérablement l'activité correcte de son RpoS. Dans ces circonstances, la production de curli chez EDL933 peut être affectée, particulièrement dans des conditions similaires où la bactérie est à l'extérieur de l'hôte. En produisant moins de curli et moins de biofilm elle serait moins capable que Sakai de survivre dans de telles conditions.

La séquence nucléotidique et en acides aminés des régulateurs négatifs des gènes curli, particulièrement les protéines FlhZ, H-NS, MqsA, ainsi que du système à deux composants RcsA/B (**Figure 9**) était similaire entre dans les deux souches. Cependant la séquence du gène du régulateur CpxR du système à deux composants CpxA/R était différente, notamment une séquence de 66 nt est absente chez EDL933, comparativement à celle de Sakai (**Figure 11A**). Ceci correspond à une absence des vingt-deux premiers acides aminés de la chaîne peptidique du domaine récepteur de la protéine CpxR dans EDL933 (**Figure 11A et B**).

A)

Séquences nucléotidiques du gène *cpxR* chez les souches Sakai et EDL933 (séquences inverses complémentaires de celles de GenBank)

Sakai

ATGAATAAAATCCTGTTAGTTGATGATGACCGAGAGCTGACTTCCCTATTAAGGAGCTGCTCGAGATGG
 AAGGCTTCAACGTGATTGTTGCCACGATGGGGAACAGGCGCTTGATCTTCTGGACGACAGCATTGATTT
 ACTTTTGCTTGACGTAATGATGCCGAAGAAAAATGGTATCGACACATTAAAAGCACTTCGCCAGACACAC
 CAGACGCCTGTCATTATGTTGACGGCGCGCGGCAGTGAACCTTGATCGCGTTCTCGGCCTTGAGCTGGGCG
 CAGATGACTATCTCCCGAAACCGTTTAAATGATCGTGAGCTGGTGGCACGTATTTCGCGCGATCCTGCGCCG
 TTCGCACTGGAGCGAGCAACAGCAAAACAACGACAACGGTTACCCGACACTGGAAGTTGATGCCTTAGTA
 CTGAATCCAGGCCGTCAGGAAGCCAGCTTCGACGGGCAAACGCTGGAGTTAACCGGTACTGAGTTTACCC
 TGCTCTATTTGCTGGCACAGCATCTGGGTGAGTGGTTTTCCCGTGAACATTTAAGCCAGGAAGTGCTGGG
 CAAACGCCTGACGCCTTTCGACCGCGCTATCGATATGCACATTTCCAACCTGCGTCGTAAACTGCCGGAT
 CGTAAAGATGGTCACCCGTGGTTTTAAACCTTGCCTGGTTCGCGGCTACCTGATGGTTTTCTGCTTCATGA

EDL933

-----ATGG
 AAGGCTTCAACGTGATTGTTGCCACGATGGGGAACAGGCGCTTGATCTTCTGGACGACAGCATTGATTT
 ACTTTTGCTTGACGTAATGATGCCGAAGAAAAATGGTATCGACACATTAAAAGCACTTCGCCAGACACAC
 CAGACGCCTGTCATTATGTTGACGGCGCGCGGCAGTGAACCTTGATCGCGTTCTCGGCCTTGAGCTGGGCG
 CAGATGACTATCTCCCGAAACCGTTTAAATGATCGTGAGCTGGTGGCACGTATTTCGCGCGATCCTGCGCCG
 TTCGCACTGGAGCGAGCAACAGCAAAACAACGACAACGGTTACCCGACACTGGAAGTTGATGCCTTAGTA
 CTGAATCCAGGCCGTCAGGAAGCCAGCTTCGACGGGCAAACGCTGGAGTTAACCGGTACTGAGTTTACCC
 TGCTCTATTTGCTGGCACAGCATCTGGGTGAGTGGTTTTCCCGTGAACATTTAAGCCAGGAAGTGCTGGG
 CAAACGCCTGACGCCTTTCGACCGCGCTATCGATATGCACATTTCCAACCTGCGTCGTAAACTGCCGGAT
 CGTAAAGATGGTCACCCGTGGTTTTAAACCTTGCCTGGTTCGCGGCTACCTGATGGTTTTCTGCTTCATGA

***cpxR* Sakai: 699 nt**

***cpxR* EDL933: 633 nt**

B)

Séquence d'acides aminés de CpxR chez les souches Sakai et EDL933 (GenBank)

Sakai

MNKILLVDDDDRELTSLLKELLEMEGFNVIVAHDGEQALDLDLDDSIDLLLLVMMPPKKNIGIDTLKALRQTH
QTPVIMLTARGSELDRVLGLELGADDYLPKPFNDRELVARIRAILRRSHWSEQQNNNDNGSPTLEVDALV
LNPGRQEASFDGQTLELTGTEFTLLYLLAQHLGQVVSREHLSQEVLGKRLTPFDRAIDMHISNLRRKLPD
RKDGHPWFKTLRGRGYLMVSAS

EDL933

-----MEGFNVIVAHDGEQALDLDLDDSIDLLLLVMMPPKKNIGIDTLKALRQTH
QTPVIMLTARGSELDRVLGLELGADDYLPKPFNDRELVARIRAILRRSHWSEQQNNNDNGSPTLEVDALV
LNPGRQEASFDGQTLELTGTEFTLLYLLAQHLGQVVSREHLSQEVLGKRLTPFDRAIDMHISNLRRKLPD
RKDGHPWFKTLRGRGYLMVSAS

CpxR Sakai: 232 aa

CpxR EDL933: 210 aa

Figure 11. Séquences (GenBank) du gène *cpxR* (inverses complémentaires) (A) et de la protéine CpxR (B), des souches Sakai et EDL933. Les nucléotides ou les acides aminés (selon 11A ou B) qui sont présents dans Sakai et absents dans EDL933 sont en rouge et surlignés en jaune.

CpxA/R est un système régulateur à deux composantes qui répond à un certain nombre de signaux environnementaux (Danese et al., 1995). CpxA est une histidine kinase sensorielle qui détecte le stress de l'enveloppe bactérienne (par exemple, une osmolarité élevée, le pH alcalin, etc.) (Dorel et al., 2006; Jubelin et al., 2005) conduisant à son autophosphorylation. Ensuite, CpxA phosphoryle à son tour le régulateur de réponse CpxR au niveau du résidu aspartate 51 du domaine récepteur N-terminal, activant les propriétés du domaine C-terminal de liaison à l'ADN (Raivio, 2005). Le régulateur CpxR influence négativement l'expression des gènes codant pour curli (Dorel et al., 1999) en se liant à des sites de reconnaissance de l'ADN qui chevauche le site de liaison de l'activateur OmpR, qui se trouvent en amont du site d'initiation de la transcription de *csgD* (Prigent-Combaret et al., 2001).

Il est possible que ces mutations dans EDL933 influencent l'effet négatif de CpxR sur la transcription des opérons codant pour curli, et sa production par rapport à Sakai. Cependant nous remarquons l'inverse, EDL933 produit moins de curli que la souche Sakai. Néanmoins, les différences génétiques entre EDL933 et Sakai peuvent influencer dans ce processus de régulation complexe.

Différences dans la régulation de la production de curli au sein STEC / EHEC

Bien que des voies classiques aient été établies chez *E. coli* pour expliquer la régulation de la formation de biofilm, certaines études suggèrent étonnamment que chez les souches STEC y compris *E. coli* O157: H7 pourrait nécessiter des ajustements aux voies de régulation déjà décrites (Uhlich et al., 2013). Il a été largement démontré que la capacité d'expression de curli et de production de biofilm chez les STEC variait considérablement (Chen et al., 2013; Uhlich et al., 2013; Vogelee et al., 2015).

Le génome de plusieurs souches cliniques de sérotype O157: H7 contient une insertion du prophage portant le gène *stx1* (codant pour la Shiga-toxine Stx1) dans le gène *mlrA* codant pour un régulateur de *csgD*, ou des mutations dans des gènes codant d'autres régulateurs de *csgD* (Uhlich et al., 2013). Il a été démontré que cela affecte dramatiquement l'expression de curli, cellulose et par la suite la formation des biofilms. Lors de l'excision du prophage *stx1*, cependant, la formation de biofilm des O157: H7 est restaurée, suggérant cette stratégie comme un mécanisme de restitution des propriétés du biofilm chez les STEC (Uhlich et al., 2016). En revanche, de nombreuses souches non O157 produisent d'importants des biofilms (Uhlich et al., 2013).

De même, l'hétérogénéité de séquence du gène *rpoS* entraînant des substitutions d'acides aminés uniques ou de protéines tronquées, a été liée à la variabilité de la production de curli et de la production de biofilm (Uhlich et al., 2013). Pourtant, certaines mutations compensatrices peuvent restaurer une expression plus élevée de *csgD* (Uhlich et al., 2017). L'un des mécanismes est via les mutations au niveau du promoteur *csgD*-10, permettent à RpoD de remplacer RpoS et de générer une expression constitutive forte de *csgD* (Uhlich et al., 2017).

D'autres différences dans la régulation des fibres de curli impliquant les régulateurs tels que les petits ARN, pourraient exister parmi des souches étudiées. Il est clair que la régulation du curli, leur rôle dans la formation du biofilm et leur interaction post-expression avec d'autres composants de la matrice sont complexes et contribuent à une forte variabilité phénotypique parmi les souches STEC.

Considérations finales

La persistance des STEC dans différents environnements en dehors de leurs réservoirs et des hôtes leur permet de s'installer dans de nouvelles niches, afin garantir leur transmission aux futurs hôtes. La capacité à croître sous forme d'autoagrégats et de biofilms de plusieurs souches STEC, et en particulier à certaines EHEC O157: H7, leur confère des avantages pour faire face aux conditions de stress dans ces milieux autant naturels qu'industriels. Il est connu que lors d'un stress environnemental les bactéries ajustent leur métabolisme et leur expression génique pour promouvoir la synthèse des structures liées à la formation de ces moyens de survie.

Dans ce projet, nous avons démontré que chez la souche Sakai qui montre un niveau élevé d'autoagrégation et de formation de biofilm, le niveau d'expression des gènes codant pour les fibres de curli est plus élevé que ceux de EDL933, qui forme moins de biofilm et qui est non-autoagglutinant. Également, nous avons démontré que la formation des autoagrégats et du biofilm de Sakai est très dépendante de la synthèse de curli (**Figure 12**).

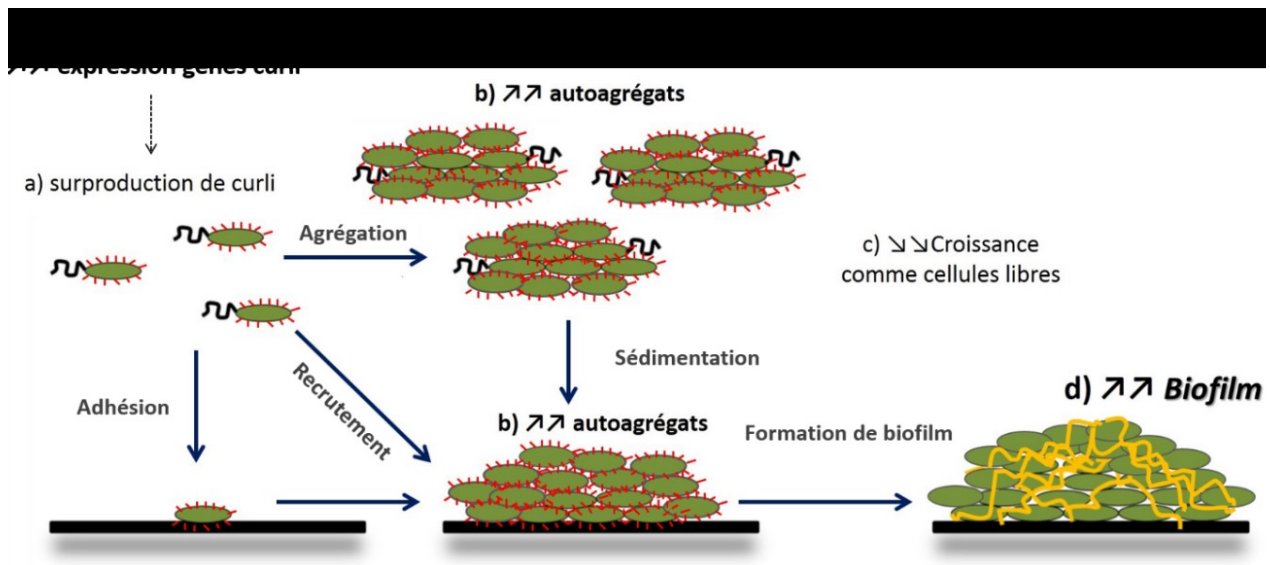


Figure 12. Modèle dérivé de celui proposé par Trunk et al. 2018, qui pourrait expliquer la formation des phénotypes à l'étude chez la souche EHEC O157: H7 Sakai, en fonction d'une possible surproduction des fibres de curli. Figure modifiée de (Trunk et al., 2018).

De plus, ce même phénomène serait mis en évidence dans un sous-groupe de souches EHEC O157: H7 (Sakai-like) présentant aussi une corrélation positive autoagrégation -formation de biofilms. C'est pourquoi, nous considérons que le haut niveau de production de curli chez Sakai et des souches Sakai-like semble être responsable du phénotype de formation d'autoagrégats, et que ceux-ci peuvent par la suite favoriser la formation de biofilms importants. Ceci peut entraîner une meilleure persistance des STEC dans différents milieux et garantir leur contamination, par exemple, les légumes et fruits, les usines de transformation des aliments, etc. Il est possible que des différences génétiques de facteurs impliqués dans la régulation de curli soient impliquées. Cela demeure à vérifier.

CONCLUSION

Dans ce projet, nous pouvons conclure que :

- ✓ Certains des gènes *csg* impliqués dans la synthèse de la fibre extracellulaire curli sont surexprimés dans la souche EHEC Sakai comparativement à la souche EDL933, ce qui provoque probablement chez Sakai une surproduction de fibres de curli. Ces fibres donc seront étroitement liées au phénotype distinct d'autoagrégation et de formation de biofilm démontré par Sakai.
- ✓ La possible surproduction de fibres amyloïdes de curli dans un sous-groupe de souches O157: H7 (*Sakai-like*) est également impliquée dans leur capacité accrue d'autoagrégation/de formation de biofilm. Ceci pourrait contribuer à leur persistance dans des niches particulières.

PERSPECTIVES

Il serait intéressant de valider le rôle de curli dans le phénotype d'autogrégation-biofilm que nous avons étudié, en utilisant des mutants des gènes cibles codant pour la biosynthèse de cette structure. Il serait aussi intéressant de poursuivre l'analyse de la production de curli par des méthodes quantitatives, afin de corroborer la surproduction dans certaines souches EHEC par rapport à d'autres. Également, il serait intéressant d'évaluer le niveau de production de curli d'un plus grand nombre de souches EHEC quant à leur capacité à former des autoagrégats et biofilms, afin de vérifier l'association du niveau de production avec ces phénotypes de persistance.

Ce projet donc, permet de mieux comprendre le mécanisme de formation de biofilm chez les STEC/EHEC. Nos résultats renforcent que la structure du curli est une cible prometteuse de stratégies futures pour contrecarrer la formation du biofilm des souches O157: H7 dans des environnements contaminés, autant naturels que industriels.

BIBLIOGRAPHIE

- Agladze, K., Wang, X., Romeo, T., 2005. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol* 187, 8237-8246.
- Amikam, D., Galperin, M.Y., 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22, 3-6.
- Anderson, G., O'toole, G., 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms, *Bacterial biofilms*. Springer, pp. 85-105.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G.H., Margalit, H., Altuvia, S.J.C.B., 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. 11, 941-950.
- Arita-Morioka, K.I., Yamanaka, K., Mizunoe, Y., Tanaka, Y., Ogura, T., Sugimoto, S., 2018. Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 8, 8452.
- Arnqvist, A., Olsén, A., Pfeifer, J., Russell, D.G., Normark, S., 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Molecular microbiology* 6, 2443-2452.
- Aslam, M., Greer, G., Nattress, F., Gill, C., McMullen, L., 2004. Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef-packing plant. *Journal of applied microbiology* 97, 78-86.
- Bae, Y.M., Baek, S.Y., Lee, S.Y., 2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *Int J Food Microbiol* 153, 465-473.
- Bak, G., Lee, J., Suk, S., Kim, D., Young Lee, J., Kim, K.S., Choi, B.S., Lee, Y., 2015. Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 5, 15287.
- Barembuch, C., Hengge, R., 2007. Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Molecular microbiology* 65, 76-89.
- Barnhart, M.M., Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60, 131-147.
- Barnhart, M.M., Lynem, J., Chapman, M.R., 2006. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5212-5219.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation* 117, 1566-1574.
- Barrios, A.F.G., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E., Wood, T.K., 2006. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of bacteriology* 188, 305-316.

- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.M., 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51, 659-674.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 57, 1506-1511.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1992. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126: H27). *Infection and immunity* 60, 13-18.
- Bhoite, S., Chapman, M., Remaut, H., 2019. Curli Biogenesis: Bacterial Amyloid Assembly by the Type VIII Secretion Pathway. *EcoSal Plus* 8.
- Bhunja, A.K., 2018. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.-Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., Schoolnik, G.K.J.S., 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. 280, 2114-2118.
- Biscola, F.T., Abe, C.M., Guth, B.E., 2011. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol* 77, 2201-2208.
- Boehm, A., Vogel, J.J.M.m., 2012. The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. 84, 1-5.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., Gyles, C.L., 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 497-503.
- Bossier, P., Verstraete, W.J.A.M., *Biotechnology*, 1996. Triggers for microbial aggregation in activated sludge? 45, 1-6.
- Botsford, J.L., Harman, J.G., 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 100-122.
- Boudeau, J., Glasser, A.-L., Masseret, E., Joly, B., Darfeuille-Michaud, A., 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and immunity* 67, 4499-4509.
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A.J., Landini, P., 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 2847-2857.
- Brown, P.K., Dozois, C.M., Nickerson, C.A., Zuppardo, A., Terlonge, J., Curtiss III, R., 2001. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 41, 349-363.

- Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., 2010. Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59, 324-336.
- Carlson-Banning, K.M., Sperandio, V., 2016. Catabolite and oxygen regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence. *MBio* 7, e01852-01816.
- Carter, M.Q., Feng, D., Li, H.H., 2019. Curli fimbriae confer shiga toxin-producing *Escherichia coli* a competitive trait in mixed biofilms. *Food Microbiol* 82, 482-488.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J., 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
- Chauhan, A., Sakamoto, C., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2013. Did I pick the right colony? Pitfalls in the study of regulation of the phase variable antigen 43 adhesin. *PLoS One* 8, e73568.
- Chen, C.-Y., Nguyen, L.-H.T., Cottrell, B.J., Irwin, P.L., Uhlich, G.A., 2016. Multiple mechanisms responsible for strong Congo-red-binding variants of *Escherichia coli* O157: H7 strains. *Pathogens and disease* 74.
- Chen, C.Y., Hofmann, C.S., Cottrell, B.J., Strobaugh, T.P., Jr., Paoli, G.C., Nguyen, L.H., Yan, X., Uhlich, G.A., 2013. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming capabilities in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *PLoS One* 8, e84863.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549.
- Chua, S.L., Liu, Y., Yam, J.K.H., Chen, Y., Vejborg, R.M., Tan, B.G.C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L., 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature communications* 5, 4462.
- Cimdins, A., Simm, R., Li, F., Luthje, P., Thorell, K., Sjoling, A., Brauner, A., Romling, U., 2017. Alterations of c-di-GMP turnover proteins modulate semi-constitutive rdar biofilm formation in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 6.
- Clarke, M.B., Sperandio, V., 2005. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and σ 28 (FlhA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 57, 1734-1749.
- Collinson, S., Doig, P., Doran, J., Clouthier, S., Kay, W., 1993. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *Journal of bacteriology* 175, 12-18.
- Collinson, S., Emödy, L., Müller, K., Kay, W., 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. *Journal of bacteriology* 173, 4773-4781.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

- Crim, S.M., Griffin, P.M., Tauxe, R., Marder, E.P., Gilliss, D., Cronquist, A.B., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K., 2015. Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US sites, 2006–2014. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 64, 495.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews microbiology* 8, 26.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 26, 822-880.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., Kolter, R., 2000. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology* 37, 424-432.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R., 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology* 182, 3593-3596.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L., Silhavy, T.J., 1995. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & development* 9, 387-398.
- Darfeuille-Michaud, A., 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *International journal of medical microbiology* 292, 185-193.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Colombel, J.-F., 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405-1413.
- Darouiche, R.O., Mansouri, M.D., Gawande, P.V., Madhyastha, S., 2009. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB® combination. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 64, 88-93.
- Deborah Chen, H., Frankel, G., 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS microbiology reviews* 29, 83-98.
- DeLisa, M.P., Wu, C.-F., Wang, L., Valdes, J.J., Bentley, W.E., 2001. DNA Microarray-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Quorum Sensing in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183, 5239-5247.
- DePas, W.H., Syed, A.K., Sifuentes, M., Lee, J.S., Warshaw, D., Saggar, V., Csankovszki, G., Boles, B.R., Chapman, M.R., 2014. Biofilm formation protects *Escherichia coli* against killing by *Caenorhabditis elegans* and *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol* 80, 7079-7087.

- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K., 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 9, 332-346.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8, 881.
- Dorel, C., Lejeune, P., Rodrigue, A., 2006. The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* 157, 306-314.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., Lejeune, P., 1999. Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 178, 169-175.
- Dourou, D., Beauchamp, C.S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K.E., Smith, G.C., Nychas, G.J., Sofos, J.N., 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J Food Microbiol* 149, 262-268.
- Duguid, J., Anderson, E., 1967. Terminology of bacterial fimbriae, or pili and their types. *Nature* 215, 89-90.
- Dunne, K., Chaudhuri, R., Rossiter, A., Beriotto, I., Cunningham, A., Browning, D.F., Squire, D., Cole, J., Loman, N., Henderson, I., 2017. Sequencing a piece of history.
- Dunne, W.M.J.C.m.r., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? 15, 155-166.
- Duprey, A., Chansavang, V., Fremion, F., Gonthier, C., Louis, Y., Lejeune, P., Springer, F., Desjardin, V., Rodrigue, A., Dorel, C., 2014. "NiCo Buster": engineering *E. coli* for fast and efficient capture of cobalt and nickel. *J Biol Eng* 8, 19.
- Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Jezek, G.E., Islas-Islas, M., Torres, A.G., 2008. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *International journal of medical microbiology* 298, 397-409.
- Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M., Laegreid, W.W., 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 2999-3003.
- Elsinghorst, E.A., Weitz, J.A., 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infection and immunity* 62, 3463-3471.
- Enami, M., Nakasone, N., Honma, Y., Kakinohana, S., Kudaka, J., Iwanaga, M., 1999. Expression of type I pili is abolished in verotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *FEMS microbiology letters* 179, 467-472.
- Etcheverria, A.I., Padola, N.L., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4, 366-372.
- Etymologia, 2015. *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2015 21, 1310.

- Evans Jr, D.J., Evans, D.G., 1983. Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with special reference to colonization-factor antigens. *Reviews of infectious diseases* 5, S692-S701.
- Evans, M.L., Chapman, M.R., 2014. Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim Biophys Acta* 1843, 1551-1558.
- Evans, M.L., Chorell, E., Taylor, J.D., Aden, J., Gotheson, A., Li, F., Koch, M., Sefer, L., Matthews, S.J., Wittung-Stafshede, P., Almqvist, F., Chapman, M.R., 2015. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Mol Cell* 57, 445-455.
- FAO/WHO, 2018. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Food: Attribution, Characterization, and Monitoring. , Microbiological Risk Assessment Series. FAO. WHO., Rome.
- Farfan, M.J., Torres, A.G., 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and immunity* 80, 903-913.
- Ferenci, T., 2003. What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends in microbiology* 11, 457-461.
- Ferens, W.A., Hovde, C.J., 2011. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease* 8, 465-487.
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M., Klemm, P.J.I., 2007. Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *75*, 30-34.
- Fleming, D., Rumbaugh, K.P., 2017. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms* 5, 15.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology* 8, 623.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews microbiology* 14, 563.
- Floyd, K.A., Moore, J.L., Eberly, A.R., Good, J.A., Shaffer, C.L., Zaver, H., Almqvist, F., Skaar, E.P., Caprioli, R.M., Hadjifrangiskou, M., 2015. Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. *PLoS Pathog* 11, e1004697.
- Fouladkhah, A., Geornaras, I., Sofos, J.N., 2013. Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella* Typhimurium and newport and their inactivation by sanitizers. *J Food Sci* 78, M880-886.
- Freter, R., Brickner, H., Fekete, J., Vickerman, M.M., Carey, K.E., 1983. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infection and immunity* 39, 686-703.
- Gagliardi, J.V., Karns, J.S., 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157: H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 877-883.

- Gallo, P.M., Rapsinski, G.J., Wilson, R.P., Oppong, G.O., Sriram, U., Goulian, M., Buttaro, B., Caricchio, R., Gallucci, S., Tukel, C., 2015. Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. *Immunity* 42, 1171-1184.
- Gerstel, U., Römling, U., 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Research in microbiology* 154, 659-667.
- Gibson, H., Taylor, J., Hall, K., Holah, J., 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of applied microbiology* 87, 41-48.
- Gilmore, B.F., 2011. Antimicrobial ionic liquids, *Ionic Liquids: Applications and Perspectives*. IntechOpen.
- Glasser, A.-L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.-H., Colombel, J.-F., Darfeuille-Michaud, A., 2001. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infection and immunity* 69, 5529-5537.
- Gophna, U., Barlev, M., Seijffers, R., Oelschlager, T., Hacker, J., Ron, E., 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and immunity* 69, 2659-2665.
- Gore, A.L., Payne, S.M., 2010. CsrA and Cra influence *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infection and immunity* 78, 4674-4682.
- Goyal, P., Krasteva, P.V., Van Gerven, N., Gubellini, F., Van den Broeck, I., Troupiotis-Tsailaki, A., Jonckheere, W., Péhau-Arnaudet, G., Pinkner, J.S., Chapman, M.R., 2014. Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. *Nature* 516, 250.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology* 2, 95.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11, 1034-1043.
- Hammar, M.r., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., Normark, S., 1995. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* 18, 661-670.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., Razatos, A., 2003. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4474-4481.
- Harrison, J.J., Turner, R.J., Ceri, H., 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 7, 981-994.
- Hasman, H., Chakraborty, T., Klemm, P., 1999. Antigen-43-Mediated Autoaggregation of *Escherichia coli* Is Blocked by Fimbriation. *Journal of bacteriology* 181, 4834-4841.

- Henderson, I.R., Meehan, M., Owen, P., 1997. A novel regulatory mechanism for a novel phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli*, Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases. Springer, pp. 349-355.
- Henderson, I.R., Owen, P., 1999. The Major Phase-Variable Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Structurally Resembles the Immunoglobulin A1 Protease Class of Exported Protein and Is Regulated by a Novel Mechanism Involving Dam and OxyR. Journal of bacteriology 181, 2132-2141.
- Hengge, R., 2010. Role of Cyclic Di-GMP in the Regulatory Networks of *Escherichia coli*, The Second Messenger Cyclic Di-GMP. American Society of Microbiology, pp. 230-252.
- Hengge, R., 2011. The general stress response in Gram-negative bacteria, Bacterial Stress Responses, Second Edition. American Society of Microbiology, pp. 251-289.
- Heras, B., Totsika, M., Peters, K.M., Paxman, J.J., Gee, C.L., Jarrott, R.J., Perugini, M.A., Whitten, A.E., Schembri, M.A., 2014. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. Proc Natl Acad Sci U S A 111, 457-462.
- Herzberg, M., Kaye, I.K., Peti, W., Wood, T.K., 2006. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. J Bacteriol 188, 587-598.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C.E., Stanley-Wall, N.R., 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiol Rev 39, 649-669.
- Holmqvist, E., Reimegård, J., Wagner, E.G.H., 2013. Massive functional mapping of a 5'-UTR by saturation mutagenesis, phenotypic sorting and deep sequencing. Nucleic acids research 41, e122-e122.
- Houari, A., Di Martino, P., 2007. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. Lett Appl Microbiol 45, 652-656.
- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D., 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Animal Health Research Reviews 11, 97-121.
- Jeter, C., Matthyse, A.G., 2005. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. Molecular plant-microbe interactions 18, 1235-1242.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Romling, U., Melefors, O., 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. Mol Microbiol 70, 236-257.
- Jose, J., Jähnig, F., Meyer, T.F., 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. Molecular microbiology 18, 378-380.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Lazzaroni, J.-C., Lejeune, P., Dorel, C., 2005. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 187, 2038-2049.

- Kalita, A., Hu, J., Torres, A.G., 2014. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Current opinion in infectious diseases* 27, 459.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology* 2, 123.
- Kaplan, J.á., 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research* 89, 205-218.
- Kaplan, J.B., 2009. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *The International journal of artificial organs* 32, 545-554.
- Karatan, E., Watnick, P., 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310-347.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4930-4940.
- Klemm, P., 1992. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae. *Research in microbiology* 143, 831-838.
- Klemm, P., Christiansen, G., 1987. Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular and General Genetics* 208, 439-445.
- Klemm, P., Jørgensen, B.J., van Die, I., de Ree, H., Bergmans, H., 1985. The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Molecular and General Genetics* 199, 410-414.
- Klemm, P., Schembri, M., 2004. Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. *EcoSal Plus* 1.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300.
- Konowalchuk, J., Speirs, J., Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 18, 775-779.
- Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V.J.M., 2016. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *7*, e00237-00216.
- Laganenka, L., Colin, R., Sourjik, V., 2016. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 7, 12984.
- Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 5, 49-59.
- Laverty, G., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3, 596-632.

- Lawrence, J., Scharf, B., Packroff, G., Neu, T., 2002. Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microbial Ecology* 44, 199-207.
- Le Bihan, G., Sicard, J.-F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A.P., Garrivier, A., Martin, C., Hay, A.G., Beaudry, F., Harel, J., 2017. The NAG sensor NagC regulates LEE gene expression and contributes to gut colonization by *Escherichia coli* O157: H7. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 134.
- Le Quéré, B., Ghigo, J.M., 2009. BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Molecular microbiology* 72, 724-740.
- Lee, J.H., Kim, Y.G., Cho, M.H., Wood, T.K., Lee, J., 2011. Transcriptomic analysis for genetic mechanisms of the factors related to biofilm formation in *Escherichia coli* O157: H7. *Curr Microbiol* 62, 1321-1330.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., Faille, C., 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26, 421-431.
- Li, X., Zhao, H., Geymonat, L., Bahrani, F., Johnson, D.E., Mobley, H., 1997. *Proteus mirabilis* mannose-resistant, *Proteus*-like fimbriae: MrpG is located at the fimbrial tip and is required for fimbrial assembly. *Infection and immunity* 65, 1327-1334.
- Lindenthal, C., Elsinghorst, E.A., 2001. Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infection and immunity* 69, 52-57.
- Lloyd, S.J., Ritchie, J.M., Torres, A.G., 2012. Fimbriation and curliation in *Escherichia coli* O157: H7. *Gut Microbes* 3, 272-276.
- Loferer, H., Hammar, M., Normark, S., 1997. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Molecular microbiology* 26, 11-23.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000398.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K.H., Bowie, W.R., Hall, E.R., 2013. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Sci Total Environ* 443, 315-323.
- Macarisin, D., Patel, J., Bauchan, G., Giron, J.A., Sharma, V.K., 2012. Role of curli and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157: H7 to spinach leaves. *Foodborne pathogens and disease* 9, 160-167.
- Magnusson, L.U., Farewell, A., Nyström, T., 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in microbiology* 13, 236-242.
- Mao, Y., Doyle, M., Chen, J., 2006. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Letters in applied microbiology* 42, 642-647.

- Marouani-Gadri, N., Chassaing, D., Carpentier, B., 2009. Comparative evaluation of biofilm formation and tolerance to a chemical shock of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *J Food Prot* 72, 157-164.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., Garcia-Gil, L.J., 2009. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 9, 202.
- Matthysse, A.G., Deora, R., Mishra, M., Torres, A.G., 2008. Polysaccharides cellulose, poly-beta-1,6-n-acetyl-D-glucosamine, and colanic acid are required for optimal binding of *Escherichia coli* O157: H7 strains to alfalfa sprouts and K-12 strains to plastic but not for binding to epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 74, 2384-2390.
- McWilliams, B.D., Torres, A.G., 2014. EHEC adhesins. *Microbiology spectrum* 2, EHEC-0003-2013.
- Melton-Celsa, A.R., 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology spectrum* 2.
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M., Hengge, R., 2012. Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84, 51-65.
- Mika, F., Hengge, R., 2013. Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* 14, 4560-4579.
- Mika, F., Hengge, R., 2014. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol* 11, 494-507.
- Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical reviews in microbiology* 35, 157-168.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11, 142-201.
- Naylor, S.W., Roe, A.J., Nart, P., Spears, K., Smith, D.G., Low, J.C., Gally, D.L., 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.
- Nenninger, A.A., Robinson, L.S., Hammer, N.D., Epstein, E.A., Badtke, M.P., Hultgren, S.J., Chapman, M.R., 2011. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol Microbiol* 81, 486-499.
- Nenninger, A.A., Robinson, L.S., Hultgren, S.J., 2009. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 900-905.
- Nhu, N.T.K., Phan, M.D., Peters, K.M., Lo, A.W., Forde, B.M., Min Chong, T., Yin, W.F., Chan, K.G., Chromek, M., Brauner, A., Chapman, M.R., Beatson, S.A., Schembri, M.A., 2018. Discovery of New Genes Involved in Curli Production by a Uropathogenic *Escherichia coli* Strain from the Highly Virulent O45:K1:H7 Lineage. *MBio* 9.

- Njoroge, J.W., Nguyen, Y., Curtis, M.M., Moreira, C.G., Sperandio, V., 2012. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio* 3, e00280-00212.
- O'Brien, A., Melton, A., Schmitt, C., McKee, M., Batts, M., Griffin, D., 1993. Profile of *Escherichia coli* O157: H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2799-2801.
- O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B., 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases* 146, 763-769.
- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C., Mercado, E., 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, 852-856.
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K., Ishihama, A., 2007. Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *Journal of bacteriology* 189, 4791-4799.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., 2011. Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J Bacteriol* 193, 2587-2597.
- Olsén, A., Jonsson, A., Normark, S., 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652.
- (OMS), O.M.d.I.S., 2019. *Escherichia coli* (*E. coli*).
- Otzen, D., Nielsen, P.H., 2008. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 910-927.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H., Henderson, I., 1996. Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 16, 63-76.
- Papenfort, K., Vogel, J.J.C.h., 2010. Regulatory RNA in bacterial pathogens. 8, 116-127.
- Park, H., Lee, K., Yeo, S., Shin, H., Holzappel, W.H., 2017. Autoinducer-2 quorum sensing influences viability of *Escherichia coli* O157: H7 under osmotic and in vitro gastrointestinal stress conditions. *Frontiers in microbiology* 8, 1077.
- Park, S.H., Cheon, H.L., Park, K.H., Chung, M.S., Choi, S.H., Ryu, S., Kang, D.H., 2012. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. *Int J Food Microbiol* 154, 130-134.
- Park, Y.J., Chen, J., 2015. Control of the Biofilms Formed by Curli- and Cellulose-Expressing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Treatments with Organic Acids and Commercial Sanitizers. *J Food Prot* 78, 990-995.

- Perez-Conesa, D., Cao, J., Chen, L., McLandsborough, L., Weiss, J., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* 74, 55-62.
- Persad, A., LeJeune, J., 2014. Animal reservoirs of Shiga.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A., Hengge, R., 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes & development* 22, 2434-2446.
- Pesavento, C., Hengge, R., 2012. The global repressor FliZ antagonizes gene expression by sigmaS-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 40, 4783-4793.
- Picozzi, C., Antoniani, D., Vigentini, I., Foschino, R., Kneifel, W., 2017. Genotypic characterization and biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 364.
- Potrykus, K., Cashel, M., 2008. (p) ppGpp: still Magical? *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 35-51.
- Povolotsky, T.L., Hengge, R., 2016. Genome-Based Comparison of Cyclic Di-GMP Signaling in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol* 198, 111-126.
- Pratt, L.A., Kolter, R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology* 30, 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., Dorel, C., 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the csgD gene. *J Bacteriol* 183, 7213-7223.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C., 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2, 450-464.
- Raghavan, R., Groisman, E.A., Ochman, H.J.G.r., 2011. Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*. *21*, 1487-1497.
- Raivio, T.L., 2005. MicroReview: Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular microbiology* 56, 1119-1128.
- Ramseier, T.M., Nègre, D., Cortay, J.-C., Scarabel, M., Cozzone, A.J., Saier Jr, M.H., 1993. In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the fru, pps, ace, pts and icd operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular biology* 234, 28-44.
- Reichhardt, C., Jacobson, A.N., Maher, M.C., Uang, J., McCrate, O.A., Eckart, M., Cegelski, L., 2015. Congo red interactions with curli-producing *E. coli* and native curli amyloid fibers. *PLoS One* 10, e0140388.
- Reisner, A., Haagensen, J.A., Schembri, M.A., Zechner, E.L., Molin, S., 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* 48, 933-946.

- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., Molin, S., 2006. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 188, 3572-3581.
- Reisner, A., Maierl, M., Jorger, M., Krause, R., Berger, D., Haid, A., Tesic, D., Zechner, E.L., 2014. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196, 931-939.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M., Wood, T.K., 2004. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 88, 630-642.
- Reshamwala, S.M., Noronha, S.B., 2011. Biofilm formation in *Escherichia coli cra* mutants is impaired due to down-regulation of curli biosynthesis. *Archives of microbiology* 193, 711.
- Rivas, E., Klein, R.J., Jones, T.A., Eddy, S.R.J.C.b., 2001. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. 11, 1369-1373.
- Robinson, L.S., Ashman, E.M., Hultgren, S.J., Chapman, M.R., 2006. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Molecular microbiology* 59, 870-881.
- Roe, A.J., Currie, C., Smith, D.G., Gally, D.L., 2001. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiology* 147, 145-152.
- Römling, U., 2012. Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environmental Microbiology* 14, 1817-1829.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., Normark, S., 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of bacteriology* 180, 722-731.
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1-52.
- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., Reinköster, J., 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular microbiology* 36, 10-23.
- Rossi, E., Cimmins, A., Luthje, P., Brauner, A., Sjoling, A., Landini, P., Römling, U., 2018. "It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol* 44, 1-30.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71, 247-254.
- Ryu, J.H., Kim, H., Beuchat, L.R., 2004. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot* 67, 2123-2131.

- Saier Jr, M.H., Ramseier, T.M., 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *Journal of bacteriology* 178, 3411.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., Bassler, B.L., 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular microbiology* 41, 463-476.
- Schembri, M.A., Christiansen, G., Klemm, P., 2001. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 41, 1419-1430.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48, 253-267.
- Seo, K., Frank, J., 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *Journal of food protection* 62, 3-9.
- Serra, D.O., Richter, A.M., Klauck, G., Mika, F., Hengge, R., 2013. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* 4, e00103-00113.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R., 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology* 121, 309-319.
- Sharma, M., Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J Appl Microbiol* 99, 449-459.
- Sharma, V.K., Bearson, S.M., Bearson, B.L., 2010. Evaluation of the effects of sdiA, a luxR homologue, on adherence and motility of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology* 156, 1303-1312.
- Sherlock, O., Schembri, M.A., Reisner, A., Klemm, P., 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 8058-8065.
- Sherlock, O., Vejborg, R.M., Klemm, P., 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and immunity* 73, 1954-1963.
- Sherrard, L.J., Tunney, M.M., Elborn, J.S., 2014. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *The Lancet* 384, 703-713.
- Shu, Q., Krezel, A.M., Cusumano, Z.T., Pinkner, J.S., Klein, R., Hultgren, S.J., Frieden, C., 2016. Solution NMR structure of CsgE: Structural insights into a chaperone and regulator protein important for functional amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7130-7135.
- Silagyi, K., Kim, S.H., Lo, Y.M., Wei, C.I., 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiol* 26, 514-519.

- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U., 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* 53, 1123-1134.
- Smith, D.R., Price, J.E., Burby, P.E., Blanco, L.P., Chamberlain, J., Chapman, M.R., 2017. The Production of Curli Amyloid Fibers Is Deeply Integrated into the Biology of *Escherichia coli*. *Biomolecules* 7.
- Solheim, H.T., Sekse, C., Urdahl, A.M., Wasteson, Y., Nesse, L.L., 2013. Biofilm as an environment for dissemination of stx genes by transduction. *Appl Environ Microbiol* 79, 896-900.
- Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397-400.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., Hengge, R., 2009. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* 155, 1318-1331.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Girón, J.A., Kaper, J.B., 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology* 183, 5187-5197.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B., 2003. Bacteria–host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8951-8956.
- Stærk, K., Khandige, S., Kolmos, H.J., Møller-Jensen, J., Andersen, T.E., 2015. Uropathogenic *Escherichia coli* express type 1 fimbriae only in surface adherent populations under physiological growth conditions. *The Journal of infectious diseases* 213, 386-394.
- Starkey, M., Parsek, M.R., Gray, K.A., Chang, S.I., 2004. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms, *Microbial biofilms*. American Society of Microbiology, pp. 174-191.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R., 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of bacteriology* 178, 4885-4893.
- Strachan, N.J., Doyle, M.P., Kasuga, F., Rotariu, O., Ogden, I.D., 2005. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* 103, 35-47.
- Sturbelle, R.T., de Avila, L.F.d.C., Roos, T.B., Borchardt, J.L., Dellagostin, O.A., Leite, F.P.L., 2015. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary microbiology* 180, 245-252.
- Sutherland, I.W., 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology* 9, 222-227.

- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T., 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 184, 5130-5140.
- Tapiainen, T., Hanni, A.M., Salo, J., Ikaheimo, I., Uhari, M., 2014. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 111-115.
- Teunis, P., Takumi, K., Shinagawa, K., 2004. Dose response for infection by *Escherichia coli* O157: H7 from outbreak data. *Risk Analysis: An International Journal* 24, 401-407.
- Thongsomboon, W., Serra, D.O., Possling, A., Hadjineophytou, C., Hengge, R., Cegelski, L., 2018. Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. *Science* 359, 334-338.
- Torres, A.G., Perna, N.T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F.R., Kaper, J.B., 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 45, 951-966.
- Tree, J.J., Ulett, G.C., Hobman, J.L., Constantinidou, C., Brown, N.L., Kershaw, C., Schembri, M.A., Jennings, M.P., McEwan, A.G.J.E.m., 2007. The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. 9, 2110-2116.
- Tremblay, Y.D., Vogeleer, P., Jacques, M., Harel, J., 2015. High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 81, 2827-2840.
- Trunk, T., Salah Khalil, H., Leo, J.C.J.A.M., 2018. Bacterial autoaggregation. 4, 140-164.
- Tursi, S.A., Tukel, C., 2018. Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. *Microbiol Mol Biol Rev* 82.
- Tyler, H.L., Triplett, E.W., 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 53-73.
- Uhlich, G.A., Chen, C.Y., Cottrell, B.J., Andreozzi, E., Irwin, P.L., Nguyen, L.H., 2017. Genome amplification and promoter mutation expand the range of *csgD*-dependent biofilm responses in an STEC population. *Microbiology* 163, 611-621.
- Uhlich, G.A., Chen, C.Y., Cottrell, B.J., Hofmann, C.S., Dudley, E.G., Strobaugh, T.P., Jr., Nguyen, L.H., 2013. Phage insertion in *mlrA* and variations in *rpoS* limit curli expression and biofilm formation in *Escherichia coli* serotype O157: H7. *Microbiology* 159, 1586-1596.
- Uhlich, G.A., Chen, C.Y., Cottrell, B.J., Hofmann, C.S., Yan, X., Nguyen, L., 2016. Stx1 prophage excision in *Escherichia coli* strain PA20 confers strong curli and biofilm formation by restoring native *mlrA*. *FEMS Microbiol Lett* 363.
- Uhlich, G.A., Chen, C.Y., Cottrell, B.J., Nguyen, L.H., 2014. Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 354, 133-141.

- Uhlich, G.A., Cooke, P.H., Solomon, E.B., 2006. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157: H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* 72, 2564-2572.
- Uhlich, G.A., Rogers, D.P., Mosier, D.A., 2010. *Escherichia coli* serotype O157: H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis* 7, 935-943.
- Vaccari, L., Molaei, M., Niepa, T.H.R., Lee, D., Leheny, R.L., Stebe, K.J., 2017. Films of bacteria at interfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 247, 561-572.
- Van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors, J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal* 5, 173.
- Van Gerven, N., Van der Verren, S.E., Reiter, D.M., Remaut, H., 2018. The role of functional amyloids in bacterial virulence. *Journal of molecular biology* 430, 3657-3684.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Moons, P., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W., 2006. N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 256, 83-89.
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 156, 626-633.
- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P., Lazzaroni, J.C., 2005. *Escherichia coli* *tol* and *rcs* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* 151, 2487-2497.
- Villegas, N.A., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverria, A., Becerra, M., Padola, N., Paraje, M., 2013. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *ScientificWorldJournal* 2013, 607258.
- Vogel, J., Bartels, V., Tang, T.H., Churakov, G., Slagter-Jäger, J.G., Hüttenhofer, A., Wagner, E.G.H.J.N.a.r., 2003. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *31*, 6435-6443.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y.D., Mafu, A.A., Jacques, M., Harel, J., 2014. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 5, 317.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y.D.N., Jubelin, G., Jacques, M., Harel, J., 2015. Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Appl Environ Microbiol* 82, 1448-1458.
- Vogeleer, Philippe; Rodriguez Olivera, Yaindry; Jacques, Mario; Harel, Josee, 2019. The truncated autotransporter YcgV contributes to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation under phosphate-limiting conditions. *FEMS microbiology letters* (submitted).
- Waldron, D.E., Owen, P., Dorman, C.J., 2002. Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 44, 509-520.

- Walters, M., Sperandio, V., 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. International journal of medical microbiology 296, 125-131.
- Wang, R., Bono, J.L., Kalchayanand, N., Shackelford, S., Harhay, D.M., 2012. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. J Food Prot 75, 1418-1428.
- Wang, X., Preston, J.F., 3rd, Romeo, T., 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. J Bacteriol 186, 2724-2734.
- Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., Gottesman, S.J.G., development, 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. 15, 1637-1651.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., Hengge, R., 2006. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 62, 1014-1034.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., Hengge, R., 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. Journal of bacteriology 187, 1591-1603.
- Wells, T.J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S.A., Torpdahl, M., Webb, R.I., Allsopp, L.P., Gobius, K.S., Gally, D.L., Schembri, M.A., 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.
- Wells, T.J., Totsika, M., Schembri, M.A., 2010. Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. Microbiology 156, 2459-2469.
- White, A., Gibson, D., Kim, W., Kay, W., Surette, M., 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. Journal of bacteriology 188, 3219-3227.
- White, A., Sibley, K., Sibley, C., Wasmuth, J., Schaefer, R., Surette, M., Edge, T., Neumann, N., 2011. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7620-7632.
- Whitney, J., Howell, P., 2013. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. Trends in microbiology 21, 63-72.
- Yang, K., Meng, J., Huang, Y.-c., Ye, L.-h., Li, G.-j., Huang, J., Chen, H.-m., 2014. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. Cell biochemistry and biophysics 70, 391-398.
- Yeh, J., Chen, J., 2004. Production of slime polysaccharide by EHEC and STEC as well as the influence of culture conditions on slime production in *Escherichia coli* O157: H7. Letters in applied microbiology 38, 488-492.

- Youssef, A., Hafez, H., Madney, Y., Elanany, M., Hassanain, O., Lehmann, L.E., El Haddad, A., 2019. Incidence, risk factors, and outcome of blood stream infections during the first 100 days post-pediatric allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantations. *Pediatr Transplant*, e13610.
- Zhang, W., Qi, W., Albert, T.J., Motiwala, A.S., Alland, D., Hyytia-Trees, E.K., Ribot, E.M., Fields, P.I., Whittam, T.S., Swaminathan, B., 2006. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome research* 16, 757-767.
- Zhao, K., Liu, M., Burgess, R.R., 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic acids research* 35, 4441-4452.
- Zhou, Y., Blanco, L.P., Smith, D.R., Chapman, M.R., 2012. Bacterial amyloids. *Methods Mol Biol* 849, 303-320.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U., 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology* 39, 1452-1463.

ANNEXES

Article 1

Soumis à « FEMS Microbiology lettres »

Implication de l'auteur dans cet article

En tant que co-auteure de l'article, j'ai participé aux expérimentations de SDS-PAGE et de Western Blot. De même, à certaines des étapes de l'obtention des mutants utilisés et de leur caractérisation phénotypique.

The truncated autotransporter YcgV contributes to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation under phosphate-limiting conditions.

AUTHORS

Philippe Vogelee¹, Yaindrys Rodriguez Olivera¹, Mario Jacques^{1,2} and Josée Harel^{1#}

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animal, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

²Op+Lait, Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

#Address of correspondence: Josée Harel, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2. Tel.: 450-773-8521 (ext. 8233); Fax: 450-778-8108; E-mail: josee.harel@umontreal.ca

Keywords: Biofilm, EHEC, O157:H7, phosphate starvation, autotransporter

ABSTRACT

In response to phosphate starvation enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 modulates the expression of the Pho regulon under the control of PhoB. This results in the activation of various survival mechanisms, including enhanced biofilm-formation. Previous transcriptomic analyses of EHEC O157:H7 grown under these conditions suggested that *ycgV* is Pho-regulated and associated with biofilm-formation. In EHEC O157:H7, *ycgV* encodes an AIDA-I type autotransporter YcgV that is much shorter than its homologues in other *E. coli* strains. The truncated form of YcgV in EHEC mainly consists of a functional passenger domain. Here we show that *ycgV* expression is directly regulated by PhoB. In addition, we show that the truncated form of YcgV contributes to EHEC O157:H7 biofilm formation under phosphate starvation conditions. Here we identify a new player that contributes to EHEC O157:H7 nutritional stress adaptation.

INTRODUCTION

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 are human pathogens that cause outbreaks of food-borne and waterborne infections (Croxen and Finlay 2010). EHEC O157:H7 encode many virulence factors, including Shiga toxins that contribute to disease in humans (Paton and Paton 1998). Some virulence factors have additional function, for example autotransporters and fimbriae are also involved in biofilm formation (Vogeleer et al. 2014). EHEC O157:H7 strains are able to form biofilms in different environments including food or processing plant surfaces and water (Donlan and Costerton 2002; Ryu et al. 2004b; Ryu and Beuchat 2005). It was also reported that EHEC O157:H7 form robust biofilms under environmental conditions that induce stress, including growth at low temperatures, in low oxygen or during nutrient starvation (Prigent-Combaret et al. 1999; Ryu et al. 2004a; Villegas et al. 2013; Vital et al. 2012). Moreover, biofilms have been postulated to promote environmental survival of EHEC O157:H7 (Segura A. et al. 2018; Van Houdt and Michiels 2010; Visvalingam et al. 2017). We previously showed that EHEC O157:H7 strain EDL933 forms biofilms during growth in a phosphate limiting environment (Chekabab et al. 2012).

Phosphate is essential for bacteria, as it is required for several cellular processes such as signal transduction and energy production (VanBogelen et al. 1996; Wanner 1996). In bacteria, phosphate homeostasis is controlled by the response regulator PhoB that modulates the expression of genes Pho regulon genes. Activation of the regulator PhoB depends on the extracellular phosphate concentration (McCleary 1996). When the extracellular phosphate concentration decreases, PhoB is activated and alters Pho regulon gene-expression levels leading to changes in phosphate metabolism and transport (Wanner 1996). Among Pho regulon members, there is the *pstSCAB-phoU* operon which encodes the phosphate-specific transport (Pst) system (Wanner 1996). The Pst system ensure proper phosphate transport under phosphate starvation conditions and any deletion of the *pstSCAB-phoU* operon leads to constitutive activation of PhoB (Rao and Torriani 1990).

We previously reported that both constitutive (Δ *pst* strain) and physiological (phosphate starvation) PhoB activation in EHEC O157:H7 strain EDL933 causes changes in outer membrane

composition, including lipopolysaccharide (LPS) modifications, that result in enhanced biofilm-formation (Vogeleer et al. 2019). The objective of this study was to identify additional Pho regulon members involved in this enhanced biofilm-formation phenotype. We found that PhoB directly regulates the expression of *ycgV*_{EDL933} (z1972), encoding a truncated AIDA-I type autotransporter, and that YcgV_{EDL933} contributes to the enhanced biofilm formation observed during growth under phosphate starvation conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. In this study, we used EHEC O157:H7 strain EDL933 and derived gene deletion strains (Table 1). *ycgV* gene deletions and complementation were both generated as previously described (Vogeleer et al. 2019). Bacteria were cultivated in M9 minimal medium or in Morpholine propanesulfonic acid minimal medium (MOPS) (Teknova, Hollister, CA, USA) media as previously described (Vogeleer et al. 2019).

***In silico* evaluation of Pho boxes.** Putative Pho boxes found upstream of biofilm related genes were detected with FIMO version 4.12.0 on the MEME suite web site (<http://meme-suite.org/tools/fimo>), as previously described (Chekabab et al. 2014).

Quantitative real time PCR (qRT-PCR). The relative copy number of *ycgV*_{EDL933} was determined by growing the Δpst , $\Delta pst + Cpst$ and $\Delta pst\Delta phoB$ strains under static biofilm-inducing conditions as previously described (Vogeleer et al. 2019). cDNA, standard curves and quantitative PCR were performed as previously described (Le Bihan et al. 2017). Data are shown as the ratio of the cDNA copy number of the gene of interest relative to the cDNA copy number of the housekeeping gene *tus*. *P*-values were calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). EMSAs were performed as previously described (Vogeleer et al. 2019).

Static biofilm formation assay. Biofilm formation was evaluated with crystal violet staining and quantified by reading the absorbance at 595nm as previously described (Vogeleer et al. 2019). In addition to measuring biofilm formation, growth of the planktonic part of the culture (unattached cells) was tracked by measuring OD₆₀₀. Relative biofilm formation corresponds to the ratio A_{595}/OD_{600} (Sicard et al. 2018). *P*-values were calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test.

Auto-agglutination assays. Auto-agglutination was determined using an assay described elsewhere (Bansal et al. 2008). *P*-values were calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test.

Preparation of membrane fraction. Subcellular fractionation was performed as previously described (Rutherford et al. 2006). Briefly, bacteria were grown as described in the biofilm-formation section. Cultures were normalized to the same OD 600nm and centrifuged at 3 700 *g* for 15 min. A volume of 9 ml of supernatants were collected, filtered through a 0.2 μ m filter and then precipitated with 10% trichloroacetic acid at 4°C overnight. Once precipitated, supernatants were centrifuged at 3 700 *g* for 45 min, resuspended in 200 μ l 1M Tris base. Pellets were resuspended in 1 ml of 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.75 mM sucrose. Lysozyme (0.4 mg/ml) and EDTA pH 8 (10 mM final) were added and the sample was kept on ice for 30 min. Samples were centrifuged and while the pellets were resuspended in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) containing the cOmplete mini™ protease inhibitor (Roche, Bâle, Switzerland). After sonication, the lysates were centrifuged at 21 000 *g* for 30 min. Supernatants containing cytoplasmic fractions, were kept on ice until needed. To solubilize the inner membrane, pellets were resuspended in 1 ml TBS containing 1% Triton X-100. After a 30 min incubation on ice, the samples were centrifuged at 21 000 *g* for 30 min. The pellets, corresponding to the outer membrane, were resuspended in TBS.

SDS-PAGE and Western blot. Fractions samples were mixed to 2X SDS-buffer, boiled for 10 min and proteins were separated on 10% acrylamide gels by SDS-PAGE at 100 volts and YcgV_{EDL933} was visualized by immunoblotting as previously described with slight modifications (Vogeleer et al. 2019). Briefly, after a 1 h transfer, the nitrocellulose membrane was blocked in 1% (w/v) skim milk dissolved in TBS-T (Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20) for 1 h. After washing steps with TBS-T, the membrane was incubated 1 h with a 1:5000 dilution of primary polyclonal antibody raised against YcgV_{EDL933} peptide (GenScript, Piscataway, NJ, USA). After washing steps with TBS-T, membrane was incubated 1 h with 1:1000 of secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000; Biorad, Hercules, CA, USA). After washing steps, the reaction was revealed by using Opti-4CN detection kit according to the manufacturer's instructions (Biorad, Hercules, CA, USA).

RESULTS

Transcriptome analysis identifies Pho regulated genes expressed during biofilm-formation

Pho-regulated genes involved in biofilm formation were identified by comparing gene transcript-levels of parental EHEC EDL933 during growth in MOPS with low inorganic phosphate (Pi)-levels (MOPS Pi⁻; PhoB activated) and the Δpst strain (PhoB constitutively activated) relative to transcript levels of EHEC EDL933 grown in Pi rich conditions (Chekabab et al. 2014; Vogeleer et al. 2019). Transcript-levels of an AIDA-like autotransporter encoded by *ycgV* (*z1972*) was upregulated more than 4 times in EHEC grown in MOPS Pi⁻ and the Δpst mutant when compared to EHEC grown in Pi-rich conditions (Vogeleer et al. 2019). To confirm these results, we performed RT-qPCR using RNA extracted from these biofilm cells. The expression level of *ycgV*_{EDL933} was 8.7 times higher in the Δpst strain growing in biofilms compared to wild-type and expression was decreased to wild-type levels upon complementation and in the $\Delta pst\Delta phoB$ strain (Figure 1A). The decreased *ycgV*_{EDL933} expression in $\Delta pst\Delta phoB$ compared to Δpst suggests *ycgV*_{EDL933} might be under the direct control of PhoB.

Activated PhoB binds the promoter region of *ycgV*

A putative Pho Box (sequence [5'GTGTAATGTTTTGTTCAT3']) was identified 256 bp upstream of the *ycgV*_{EDL933} promoter region. To investigate whether PhoB binds directly to the *ycgV*_{EDL933} promoter, EMSA experiments were performed using PhoB^{CA}, a constitutively active PhoB variant that binds Pho regulon promoters in the absence of phosphorylation. A PhoB dependent migration shift was observed for the probes designed from the promoter regions of *ycgV*_{EDL933} and *phoB*, the positive control (Figure 1B). The addition of unlabelled probes (2:1) reduced the amount of shifted 6-FAM labelled probes. As expected, no shift in migration was observed for the probe from the pKan promoter region (Figure 1B). These data indicate that PhoB^{CA} binds specifically to the *ycgV*_{EDL933} promoter region *in vitro*.

YcgV_{EDL933} contributes to biofilm formation by EHEC strain EDL933

During growth in MOPS Pi⁻, *ycgV*_{EDL933} expression was upregulated and biofilm formation was increased (Figure 2A). The same phenotypes were observed in the Δ *pst* strain that is used to mimic low phosphate conditions (PhoB is constitutively activated). To determine whether YcgV contributes to biofilm-formation, *ycgV* deletion strains were generated in the parental and Δ *pst* backgrounds. When PhoB is constitutively activated, the Δ *pst* Δ *ycgV* strain had a significantly reduced biofilm formation compared to the isogenic Δ *pst* mutant. Biofilm-formation was restored to Δ *pst*-levels upon complementation of Δ *pst* Δ *ycgV* with *ycgV*_{EDL933} (Figure 2B). In MOPS Pi⁻, the biofilm-formation ability of the Δ *ycgV* strain was reduced compared to EDL933. The biofilm-formation levels were restored to wild-type levels upon complementation of Δ *ycgV* with *ycgV* (Figure 2A). Interestingly, biofilm formation by the Δ *ycgV* strain was unaffected when grown in Pi rich conditions (in M9 or in MOPS Pi⁺). In addition, *ycgV* deletion or overexpression did not influence the autoagglutination ability of the strains (Figure 2C). This indicates that YcgV_{EDL933} does not contribute to the autoagglutination observed in the Δ *pst* mutant. Taken together, these results show that YcgV_{EDL933} is involved in phosphate-dependant biofilm formation by EHEC strain EDL933.

In EDL933, *ycgV*_{EDL933} encodes a truncated AIDA-I type autotransporter

The YcgV_{EDL933} coding region shares homology with *E. coli* K-12, with a deletion of 3136 bp corresponding to the 3' coding sequence of *ycgV* and a deletion of the *dhaR* gene encoding the regulator of the *dhaKLM* operon which encodes three subunits of the dihydroxyacetone (DHA) kinase upstream of *dhaR* (Figure 3A).

In *E. coli* K-12, the *ycgV* gene encode a 955 amino acid monomeric AIDA-I like autotransporter that contains an N-terminal signal sequence, a functional passenger domain, a linker region and a C-terminal translocator domain (β domain). The *ycgV*_{EDL933} gene in EHEC is predicted to produce a 547 aa protein made up of an N-terminal signal peptide and a passenger domain that share 97.8 % identity with YcgV_{MG1655} (Figure 3B). To evaluate if YcgV_{EDL933} is commonly found among other O157:H7 strains, the protein sequence of YcgV_{EDL933} was blasted against O157:H7 genomes found on the NCBI web site. YcgV_{EDL933} was detected in 56.3 % of O157:H7 strains (76/135), while YcgV_{MG1655} was only present in 17.8% of O157:H7 (24/135) strains and 21.5% of O157:H7 strains encoded a shorter form of YcgV at 386 aa (29/135) (Figure 3B).

YcgV_{EDL933} is present in the outer membrane

To determine the subcellular localization of YcgV_{EDL933} (periplasm, inner membrane, outer membrane, or supernatant) bacteria were fractionated and YcgV_{EDL933} was detected with an anti-YcgV_{EDL933} antibody. Two bands of approximately 60 and 65kDa, corresponding to the predicted molecular mass of YcgV_{EDL933} (60kDa), were detected only in the outer membrane fraction of strains overexpressing *ycgV*_{EDL933} (EDL933, Δ *ycgV* and Δ *pst* Δ *ycgV* harboring pTrc99A::*ycgV* supplemented with 1 mM IPTG) (Figure 4). This result shows that YcgV_{EDL933} is found in the outer membrane of EDL933 and in the outer membrane of the complementation strain when YcgV is overproduced.

DISCUSSION

YcgV_{EDL933} is a Pho regulon member

Here we show that *ycgV*_{EDL933} in *E. coli* O157:H7 EDL933 encodes a truncated AIDA-I type autotransporter and its expression is regulated by environmental phosphate levels. YcgV belongs to the self-associating autotransporter (SAAT) family known to have roles in adhesion to epithelial cells, autoagglutination and/or biofilm formation (Allsopp et al. 2010; Charbonneau et al. 2009; Martinez-Gil et al. 2017; Wells et al. 2008; Wells et al. 2010). Wells and collaborators reported that the YcgV-encoding gene was found in the majority of commensal and DEC genomes but was truncated in 2 EHEC strains and absent in UPEC (Wells et al. 2010). Our analyses revealed the *ycgV*_{EDL933} variant is common in most *E. coli* O157:H7 strains. It was proposed by Wells *et al.*, that *E. coli* pathotypes have different combinations of autotransporter proteins that might each perform specific functions in their environment (Wells et al. 2010). In the same line we propose that truncated YcgV_{EDL933} plays a specific function in *E. coli* O157:H7 during phosphate starvation.

Moreover, YcgV_{EDL933} is involved in EDL933 O157:H7 biofilm formation upon phosphate starvation. In *E. coli* K-12, YcgV overexpression increases adhesion and biofilm formation (Roux et al. 2005). In addition, an association between SAAT, autoagglutination and biofilm formation has been reported (Allsopp et al. 2010; Martinez-Gil et al. 2017; Wells et al. 2008; Wells et al. 2010). In 2008, Beloin *et al.*, proposed that the functions of autotransporters such as YcgV might only be revealed when the bacteria are grown under specific physiological conditions (Beloin et al. 2008). In our study, growth under phosphate starvation conditions identified the contribution of YcgV_{EDL933} to biofilm formation.

In this study, we show that *ycgV*_{EDL933} expression is increased in the Δ *pst* strain of *E. coli* O157:H7 (constitutively activated PhoB) and upon Pi starvation (MOPS Pi⁻). In another study, *ycgV* upregulation was also observed in a *pst* deletion in avian pathogenic *E. coli* O78 strain χ 7122, suggesting PhoB might also regulate *ycgV* in this strain (Crepin et al. 2008). Here we provide evidence that PhoB interacts directly with the putative Pho box we identified in the promoter region of *ycgV*_{EDL933}. A putative Pho box upstream of *ycgV* was also detected *in silico* in other *E. coli* strains, including K-12 strain MG1655 and APEC O78 strain χ 7122. Therefore, it is likely that

ycgV expression in other *E. coli* strain is modulated by the PhoB regulon in response to low phosphate stress. However, the role of YcgV in biofilm formation under low phosphate conditions has yet to be investigated in other *E. coli* strains. Interestingly, *ycgV* was identified in a high-throughput screen of *E. coli* K-12 mutants with defective cell envelope assembly (Paradis-Bleau et al. 2014), indicating that the absence YcgV might alter cell envelope integrity.

As YcgV_{EDL933} is truncated and consists mainly of the SAAT passenger domain, it was unexpected to discover that this YcgV variant has a role in biofilm formation. Full-length AIDA-1 autotransporters export their SAAT passenger domains via the type V secretion pathway, which normally follows a two-step secretion mechanism. The translocator domain (β -domain) of the autotransporter facilitates the translocation of the passenger across the outer membrane (Henderson et al. 2004). However, other accessory factors such as the β -barrel assembly machinery (Bam) complex or periplasmic chaperone proteins were shown to play an important part in the translocation process of SAAT to the cell surface (Henderson et al. 2004; Vo et al. 2017). Two other proteins, TamA and TamB, from the translocation and assembly module (TAM) were shown to be involved in the translocation of autotransporters in proteobacteria (Selkrig et al. 2012). Therefore, it was unexpected that YcgV_{EDL933}, which lacks the linker and translocator (β -domain), was detected in the outer membrane fraction when overexpressed. It remains unknown how YcgV_{EDL933} gets to the outer membrane, or if it is surface exposed. As the *E. coli* O157:H7 membrane undergoes several modifications upon stress generated by phosphate starvation and Pho regulon activation (Chekabab et al. 2014), it is possible that under these conditions, *ycgV*_{EDL933} is inserted in the membrane where it contributes to biofilm formation. In conclusion, we identify an SAAT that contributes to EHEC O157:H7 biofilm formation in response to a nutritional stress. Our results illustrate how pathogens such as O157:H7 thrive in different ecological niches.

FUNDING

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN SD-25120-09 to J.H.) and Fonds de la recherche du Québec en nature et technologies (FRQNT PT165375 to J.H. and M.J.) and a scholarship from FRQNT Québec Wallonie program (FRQNT Regroupements stratégiques 111946 to P.V.).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Frederic Berthiaume for technical assistance, Dr. Jenny Lee Thomassin for her critical reading, proofreading and editing the manuscript, and Dr. Yannick D.N. Tremblay for his constructive feedback, expertise and technical assistance. All the authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Allsopp, L. P., et al. (2010), UpaH is a newly identified autotransporter protein that contributes to biofilm formation and bladder colonization by uropathogenic *Escherichia coli* CFT073, *Infect Immun*, 78 (4), 1659-69.
- Bansal, T., et al. (2008), Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2, *Appl Microbiol Biotechnol*, 78 (5), 811-9.
- Beloin, C., Roux, A., and Ghigo, J. M. (2008), *Escherichia coli* biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 249-89.
- Charbonneau, M. E., Janvore, J., and Mourez, M. (2009), Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter: a new mechanism involving acidic residues in the junction region, *J Biol Chem*, 284 (25), 17340-51.
- Chekabab, S. M., et al. (2014), PhoB activates *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation, *PLoS One*, 9 (4), e94285.
- Chekabab, S. M., et al. (2012), Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of *Acanthamoeba castellanii* and its dependence on Pho regulon, *Microbiologyopen*, 1 (4), 427-37.
- Crepin, S., et al. (2008), Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant, *BMC Genomics*, 9, 568.
- Croxen, M. A. and Finlay, B. B. (2010), Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity, *Nat Rev Microbiol*, 8 (1), 26-38.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002), Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev*, 15 (2), 167-93.
- Henderson, I. R., et al. (2004), Type V protein secretion pathway: the autotransporter story, *Microbiol Mol Biol Rev*, 68 (4), 692-744.
- Le Bihan, G., et al. (2017), The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 134.
- Martinez-Gil, M., et al. (2017), YeeJ is an inverse autotransporter from *Escherichia coli* that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation, *Sci Rep*, 7 (1), 11326.
- McCleary, W. R. (1996), The activation of PhoB by acetylphosphate, *Mol Microbiol*, 20 (6), 1155-63.
- Paradis-Bleau, C., et al. (2014), A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism, *PLoS Genet*, 10 (1), e1004056.
- Paton, A. W. and Paton, J. C. (1998), Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*, *J Clin Microbiol*, 36 (2), 598-602.
- Prigent-Combaret, C., et al. (1999), Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 181 (19), 5993-6002.
- Rao, N. N. and Torriani, A. (1990), Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 4 (7), 1083-90.
- Roux, Agnès, Beloin, Christophe, and Ghigo, Jean-Marc (2005), Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins, *Journal of bacteriology*, 187 (3), 1001-13.

- Rutherford, N., et al. (2006), The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation, *J Bacteriol*, 188 (11), 4111-6.
- Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. (2005), Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine, *Appl Environ Microbiol*, 71 (1), 247-54.
- Ryu, J. H., Kim, H., and Beuchat, L. R. (2004a), Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature, *J Food Prot*, 67 (10), 2123-31.
- Ryu, J. H., et al. (2004b), Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production, *Lett Appl Microbiol*, 39 (4), 359-62.
- Segura A., et al. (2018), Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content, *Frontiers in Microbiology*.
- Selkrig, J., et al. (2012), Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes, *Nat Struct Mol Biol*, 19 (5), 506-10, S1.
- Sicard, J. F., et al. (2018), N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*, *Gut Pathog*, 10, 26.
- Van Houdt, R. and Michiels, C. W. (2010), Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface, *J Appl Microbiol*, 109 (4), 1117-31.
- VanBogelen, R. A., et al. (1996), Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 178 (15), 4344-66.
- Villegas, N. A., et al. (2013), Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection, *ScientificWorldJournal*, 2013, 607258.
- Visvalingam, J., Ells, T. C., and Yang, X. (2017), Impact of persistent and nonpersistent generic *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* recovered from a beef packing plant on biofilm formation by *E. coli* O157, *J Appl Microbiol*, 123 (6), 1512-21.
- Vital, M., Hammes, F., and Egli, T. (2012), Competition of *Escherichia coli* O157 with a drinking water bacterial community at low nutrient concentrations, *Water Res*, 46 (19), 6279-90.
- Vo, J. L., et al. (2017), Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* Pathogenesis, *Proteomics*, 17 (23-24).
- Vogeleer, P., et al. (2014), Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*, *Front Microbiol*, 5, 317.
- Vogeleer, P., et al. (2019), Regulation of *waaH* by PhoB during Pi starvation promotes biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7, *J Bacteriol*.
- Wanner, B. L. (1996), Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon, ed. Curtiss III R Neidhardt FC, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, et al., editors (*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. ; Washington, D.C.: ASM Press).
- Wells, T. J., Totsika, M., and Schembri, M. A. (2010), Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization, *Microbiology*, 156 (Pt 8), 2459-69.
- Wells, T. J., 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 (3), 589-604.

Figures & Tables

Figures

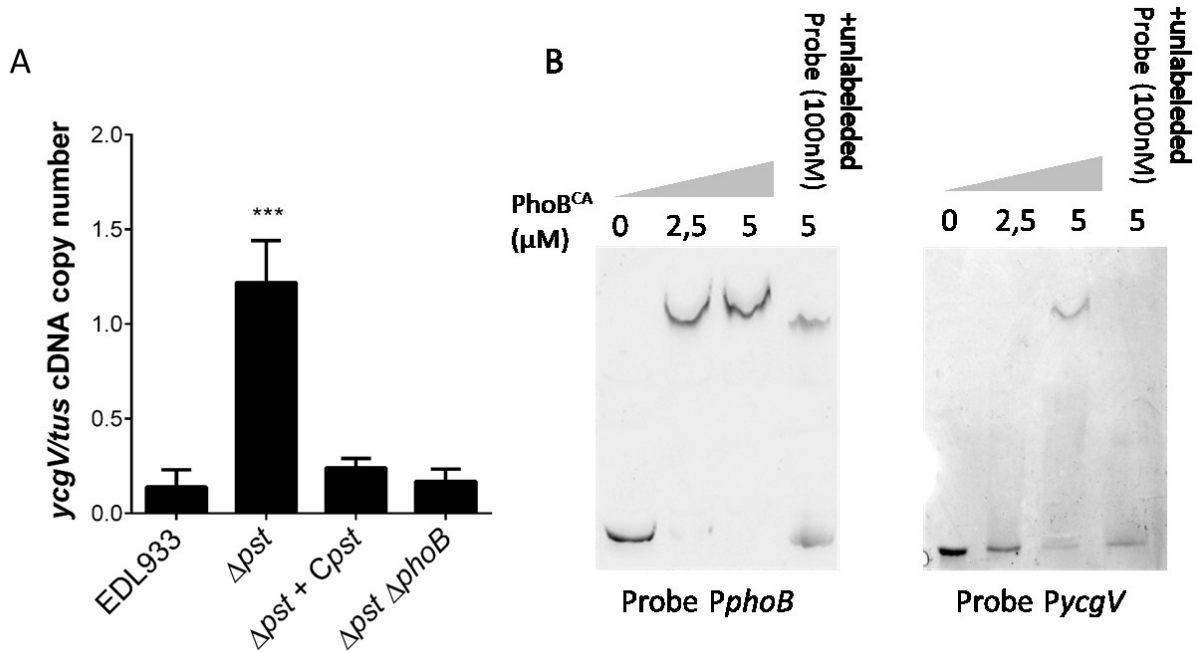


Figure 1. PhoB regulates expression of *ycgV*_{EDL933} and binds to its promoter region. **A.** Transcription of *ycgV* in the indicated EHEC O157:H7 EDL933 strains grown as biofilms in M9 glycerol 0.2% for 24h at 30°C. cDNA was synthesized from RNA extracted from biofilm and relative cDNA copy numbers were analysed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test. ***, $P < 0.001$. Results are shown as the ratio copy number of gene transcripts/copy number of *tus* transcripts. **B.** EMSAs of PhoB^{CA} and 6-FAM labeled DNA probes amplified from the promoter regions of *phoB* (+2 to -218) and *ycgV*_{EDL933} (-141 to -344 bp). DNA probes were incubated with increasing amounts (0, 2.5 μM or 5 μM) of PhoB^{CA}. As a control, cold probe was added to compete with the protein-DNA interaction.

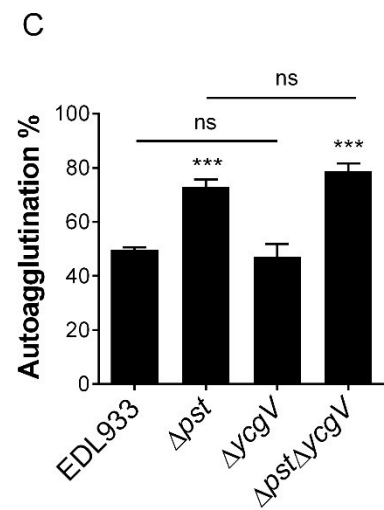
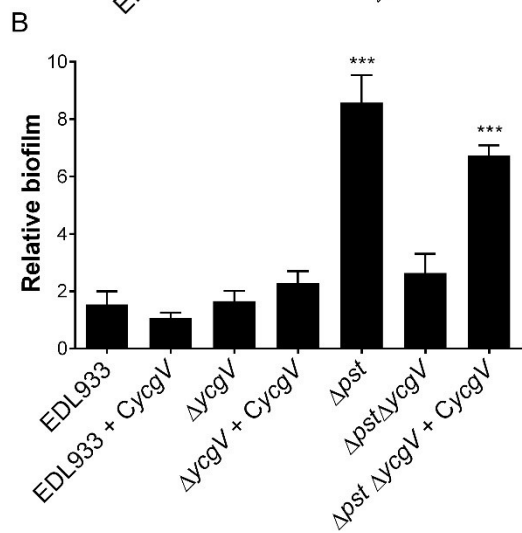
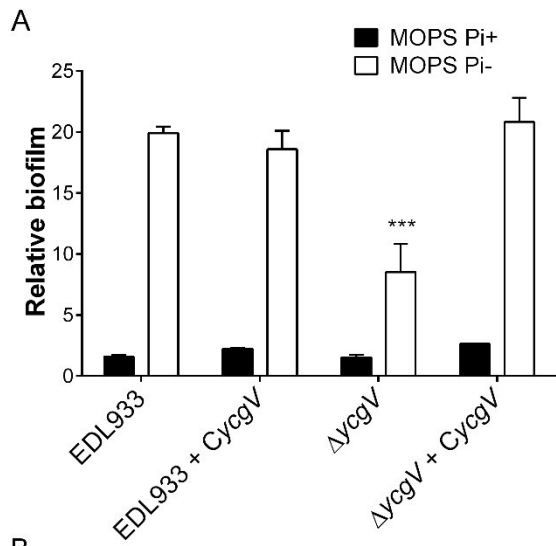


Figure 2. Truncated YcgV_{EDL933} is involved in EHEC O157:H7 EDL933 biofilm formation. A. Relative biofilm formation of the indicated EHEC strains grown in MOPS Pi⁺ (black bars) or in MOPS Pi⁻ (white bars). B. Relative biofilm formation of the indicated EHEC strains grown in M9. C. Autoagglutination of the indicated EHEC strains after 24 h growth in M9. Results shown are means \pm SD from at least 3 biological replicates. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test (Figure 2A) or one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple-comparison *post hoc* test (Figure 2B and 2C). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

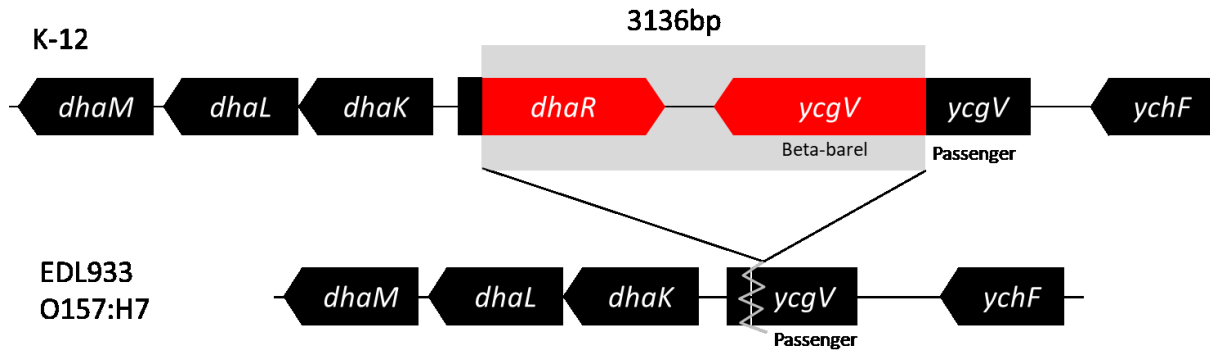
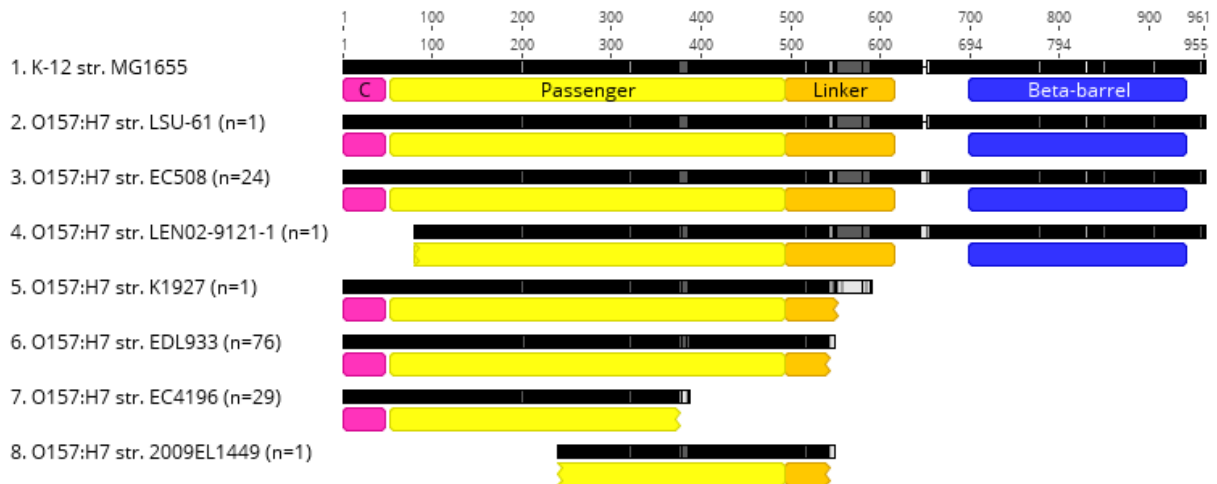
A**B**

Figure 3. Genomic context and comparison of YcgV homologues in different *E. coli* strains. A. Comparison of the genomic context of *ycgV* in *E. coli* K-12 str. MG1655 (above sequence) and that of *ycgV*_{EDL933} in *E. coli* O157:H7 str. EDL933 (Bottom). The sequence in red represents the 3136 bp deletion observed in most sequenced *E. coli* O157:H7 isolates. B. Seven unique YcgV variants were identified by BLAST analysis comparing YcgV homologues across 135 *E. coli* O157:H7 strains. Some variants were highly similar to YcgV in the *E. coli* K12 reference strain MG1655. All analysed YcgV sequences were obtained from the NCBI website. The number of isolates with similar YcgV sequences are indicated by n=x. The peptide signal (pink), the passenger (yellow), the linker (orange), the β -barrel (blue) domains are indicated. YcgV domains were predicted using Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/>) website.

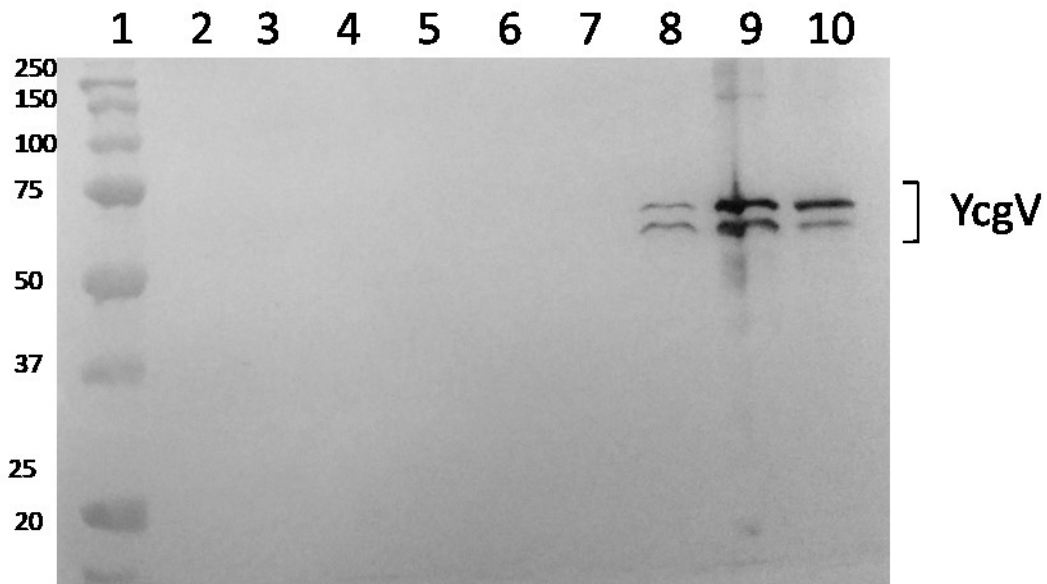


Figure 4. *YcgV*_{EDL933} is detected in the outer membrane fraction. *YcgV* was detected by western blot in outer membrane fractions isolated from different EHEC O157:H7 strains. 1. Molecular weight; 2. EDL933; 3. Δpst ; 4. $\Delta ycgV$; 5. $\Delta pst\Delta ycgV$; 6. $\Delta ycgV + CycgV$; 7. $\Delta pst \Delta ycgV + CycgV$; 8. EDL933 + *CycgV*; 9. $\Delta ycgV + CycgV$; 10. $\Delta pst\Delta ycgV + CycgV$. Lanes 2 to 7 correspond to outer membrane fractions isolated from strains grown without IPTG induction and lanes 8 to 10 correspond to strains grown in the presence of 1 mM IPTG to induce overexpression of *ycgV*_{EDL933}.

Tables

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
Strain		
EDL933	<i>E. coli</i> O157:H7; wild-type	(Strockbine et al. 1986)
EDL933 + <i>CycgV</i>	<i>E. coli</i> O157:H7; wild-type + pTrc99A:: <i>ycgV</i> _{EDL933} (tc ^R)	This study
Δ <i>pst</i>	EDL933 Δ <i>pstCAB</i> :: <i>aphA</i> (km ^R)	(Chekabab et al. 2012)
Δ <i>ycgV</i>	EDL933 Δ <i>ycgV</i> _{EDL933} :: <i>tetR</i> (tc ^R)	This study
Δ <i>ycgV</i> + <i>CycgV</i>	EDL933 Δ <i>ycgV</i> _{EDL933} :: <i>tetR</i> + pTrc99A:: <i>ycgV</i> _{EDL933} (tc ^R , amp ^R)	This study
Δ <i>pst</i> Δ <i>ycgV</i>	EDL933 Δ <i>pstCAB</i> :: <i>aphA</i> ; Δ <i>ycgV</i> _{EDL933} :: <i>tetR</i> (km ^R , tc ^R)	This study
Δ <i>pst</i> Δ <i>ycgV</i> + <i>CycgV</i>	EDL933 Δ <i>pstCAB</i> :: <i>aphA</i> ; Δ <i>ycgV</i> _{EDL933} :: <i>tetR</i> + pTrc99A- <i>ycgV</i> _{EDL933} (km ^R , tc ^R , amp ^R)	This study
χ 7213	SM10 λ pir Δ <i>asdA4</i> (km ^R)	(Kang et al. 2002)
Plasmid		
pMEG-375	<i>sacRB</i> mobRP4 oriR6K (cm ^R , amp ^R)	S. Tinge, Megan Health Inc
pACYC184:: <i>pst</i>	pACYC184, <i>pst</i> operon (cm ^R , tc ^R)	(Kang et al. 2002)
pTrc99A:: <i>ycgV</i> _{EDL933}	pTrc99A, <i>ycgV</i> _{EDL933} (amp ^R , tc ^R)	This study
pGEM [®] -T	Cloning vector	Promega

Article 2

Publié dans « *Gut Pathogens* »

Sicard et al. Gut Pathog (2018) 10:26

Implication de l'auteur dans cet article

En tant que co-auteur de l'article, j'ai participé à des expériences sur l'expression des gènes étudiés dans les souches d'intérêt, ainsi qu'à ces expériences qui ont été faites à la suggestion des évaluateurs de l'article pour publication.

N-acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*

Authors

Jean-Félix Sicard¹, Philippe Vogeleer¹, Guillaume Le Bihan¹, Yaindrys Rodriguez Olivera¹, Francis Beaudry¹, Mario Jacques² and Josée Harel^{1*}.

*Correspondence: josee.harel@umontreal.ca

Abstract

Background: The intestinal mucous layer is a physical barrier that limits the contact between bacteria and host epithelial cells. There is growing evidence that microbiota-produced metabolites can also be specifically sensed by gut pathogens as signals to induce or repress virulence genes. Many *E. coli*, including adherent and invasive (AIEC) strains, can form biofilm. This property can promote their intestinal colonization and resistance to immune mechanisms. We sought to evaluate the impact of mucus-derived sugars on biofilm formation of *E. coli*.

Results: We show that the mucin sugar N-acetyl-glucosamine (NAG) can reduce biofilm formation of AIEC strain LF82. We demonstrated that the inactivation of the regulatory protein NagC, by addition of NAG or by mutation of *nagC* gene, reduced the biofilm formation of LF82 in static condition. Interestingly, real-time monitoring of biofilm formation of LF82 using microfluidic system showed that the mutation of *nagC* impairs the early process of biofilm development of LF82. Thus, NAG sensor NagC is involved in the early steps of biofilm formation of AIEC strain LF82 under both static and dynamic conditions. Its implication is partly due to the activation of type 1 fimbriae. NAG can also influence biofilm formation of other intestinal *E. coli* strains.

Conclusions: This study highlights how catabolism can be involved in biofilm formation of *E. coli*. Mucus-derived sugars can influence virulence properties of pathogenic *E. coli* and this study will help us better understand the mechanisms used to prevent colonization of the intestinal mucosa.

Key words: *Escherichia coli*, AIEC, biofilms, mucus, N-acetyl-glucosamine

Background

Escherichia coli is a highly versatile bacterial species commonly found as part of the intestinal microbiota of warm-blooded animals. Most isolates are harmless but some have acquired virulence genes that allow them to cause numerous diseases within the gut (intestinal pathogenic *E. coli*, InPEC) or extra-intestinally (extra-intestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC). Commensal *E. coli* colonize the large intestine in vertebrates and appear to reside inside the mucus layer without contacting the underlying epithelium [1]. In contrast, InPEC possess the ability to penetrate the mucus layer and colonize the mucosa causing disease such as diarrhea [2]. Adherent-invasive *E. coli* (AIEC) strains share many genetic and phenotypic features with ExPEC strains but are rather involved in inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) [3-5].

The mucus layer that covers the intestinal epithelium plays a critical role in gut homeostasis. The intestinal mucus contains mucins, which are highly O-glycosylated proteins. Mucins play an important role in shaping the intestinal microbiota as an alteration of the glycan availability modifies the microbiota composition [6]. By producing specific glycosidases, several species of the gut microbiota release sugars from O-glycans into the intestinal lumen [7, 8]. Released mucus-derived sugars, including N-acetylglucosamine (NAG), N-acetylneuraminic acid (NANA), galactose, fucose, mannose and N-acetylgalactosamine provide direct source of carbohydrates and promote the growth of commensal and pathogenic bacteria including *E. coli* [7-10]. In addition to their role as nutrients, some mucus-derived sugars can act as regulatory signals that influence bacterial colonization and adherence to intestinal cells [11-14]. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) uses fucose, NAG and NANA as signaling molecules to modulate its metabolism and regulate the expression of its virulence repertoire [12, 15]. We recently showed that the catabolism of NAG and NANA inhibits EHEC adhesion to epithelial cells through down-regulation of the locus of enterocytes effacement expression under NagC regulatory control [16].

Biofilms could play a key role in bacterial colonization of the healthy gut and in intestinal diseases. Mucin has been reported to be involved in biofilm formation by *E. coli* [17, 18], suggesting its potential role in modulating *E. coli* colonization in the intestinal tract. The ability of biofilm formation *in vitro* varies extensively among *E. coli* isolates [19] and many *E. coli* strains are

believed to form biofilm in the intestinal tract [20]. As such, AIEC are known to be higher biofilm producers than non-AIEC strains [21]. The ability to form biofilm could be part of the etiology of IBD since an increased presence of biofilms formed by the *Bacteroides fragilis* group and the *Enterobacteriaceae* family has been observed in intestinal biopsy specimens of people affected with these diseases [22, 23].

Alteration of the gut mucosal integrity and of microbiota could also change the mucus-derived sugars availability. Our hypothesis is that in healthy conditions, the integrity of the intestinal mucus and the functions of gut microbiota prevent biofilm formation of pathogenic *E. coli*. We evaluated the influence of mucus-derived sugars on biofilm formation of AIEC reference strain LF82. We show that NAG can reduce biofilm formation of LF82 and that the transcriptional regulator of NAG catabolism, NagC appears to be involved in the early steps of its biofilm formation. We also showed that mucus-derived sugars can influence biofilm formation of different *E. coli* strains from other pathotypes.

Methods

Bacterial strains and growth conditions.

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Bacteria were routinely cultured on lysogeny broth (LB) agar (1% [wt/vol] tryptone, 0.5% [wt/vol] yeast extract, 1% [wt/vol] NaCl, 1.5% [wt/vol] agar) at 37°C and single colonies were transferred in liquid LB. When required, the growth medium was supplemented with kanamycin (50 µg/ml) and/or chloramphenicol (25 µg/ml). A set of commensal and pathogenic *E. coli* that comprises AIEC strain LF82, EHEC strain EDL933, enteroagregative *E. coli* (EAEC) strain 17.2, laboratory *E. coli* (K-12) strain MG1655 as well as commensal murine *E. coli* strain NC101 were included in the biofilm studies.

Mutagenesis and complementation.

The LF82 Δ nagC mutant was constructed by allelic exchange using a suicide vector as described in our previous work [16]. Primers used for mutagenesis are listed in Table S1 (Additional File 1). Briefly, the suicide vector pMEG-375 containing the kanamycin resistance cassette from pKD13

flanked with 500 pb sequences upstream and downstream of the *nagC* open reading frame (ORF) was transformed in a diaminopimelic acid auxotrophic *E. coli* strain χ 7213 (λ *pir* and Δ *asdA4*). χ 7213 was used as a donor to transfer the plasmid in *E. coli* strain LF82 by conjugation. Single crossover mutants were selected on LB agar without diaminopimelic acid, containing kanamycin. A second selection of double crossovers mutants was made using the *sacB* counter selection on LB agar without NaCl, containing 10 % (wt/vol) of sucrose [24]. The mutation of *nagC* was confirmed by PCR and sequencing of an amplicon containing the region of interest. Complementation was performed using a derivative of the expression vector. The ORF of *nagC* was amplified in *E. coli* strain LF82 and inserted downstream of the pTrc promoter in the expression plasmid forming the *pnagC*. A resistance cassette of chloramphenicol was amplified from pACYC184 and inserted in *pnagC*, forming the *pnagC*-JFS.

Static biofilm assay

The assay of biofilm formation was done in 96-well microtiter plates as previously described [25]. Isolated colonies from LB agar were resuspended in fresh LB (5 ml) and incubated at 37°C with shaking (180 rpm). Overnight cultures were diluted (1:100) in fresh medium; either LB, LB without salt (LBWS) or M9 medium with 0.4 % glucose (wt/vol) and minerals (1.2 mM MgSO₄, 2 μ M FeCl₃, 8 μ M CaCl₂, and 16 μ M MnCl₂). When required, the growth medium was supplemented with NAG, NANA or fucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1 mM. A volume of 150 μ l of these cultures was deposited in triplicate in the wells. Plates were incubated either at 30 °C or 37 °C for 24 hours, without shaking. After incubation, total growth was measured at OD₆₃₀ with a microplate reader (PowerWave; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Afterwards, the media were discarded, and each well washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove unattached cells. The biofilms were stained with crystal violet 0.1 % (wt/vol) for 2 min at room temperature. The crystal violet solution was removed, and the biofilms washed six times with PBS. Finally, an 80% (vol/vol) ethanol and 20% (vol/vol) acetone solution was added to release the stain and the amount of biofilm quantified by measuring at OD₅₉₅. Specific biofilm formation (SBF) index was calculated [21, 26]. Results are the ratio of biofilm measured at OD₅₉₅ over total growth measured at OD₆₃₀. To evaluate the effects of mucus-derived sugars addition on biofilm formation of different strains, one-way ANOVA with

Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate p-values. To evaluate the impact of the mutation of *nagC* on AIEC strain LF82, two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test was performed to calculate p-values *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Flow-through biofilm assay (BioFlux device).

The biofilm formation assay in the BioFlux 200 device (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA) was adapted from our previous work [25]. Biofilm formation occurs in the microfluidic channel of the device where fresh media constantly flow through causing a shear force that is similar to physiological condition [25]. *E. coli* strains were isolated on LB agar and resuspended in 5 ml of fresh LB medium. They were incubated overnight at 37 °C with shaking (180 rpm). A 0.5 ml volume of culture was transferred to a microtube and bacteria were collected by centrifugation (13,000g, 2 min). LB medium was used to resuspend the pellet to an $OD_{600} \approx 1$. Prewarmed LB \pm NAG [1mM] was injected in the microfluidic system to fill the channels. Bacteria were injected from the output reservoir for 30 s at 0.5 dyne/cm². The microfluidic plate was incubated at 30 °C for 2 h to allow the adhesion of bacteria on the surface of the channels. After adhesion, prewarmed LB \pm NAG [1mM] was added to the inlet wells and the microfluidic plate was connected to the BioFlux system. Temperature was adjusted to 30°C and the flow was initiated at 1.0 dyne/cm². After 4 hours, the used medium was removed from the outlet well and prewarmed fresh medium was added in the inlet well. Flow was then reduced at 0.5 dyne/cm² for the next 18 hours. Images of the BioFlux biofilms were obtained with an inverted optic microscope equipped with a 40X objective (CKX41; Olympus, Markham, ON, Canada), a digital camera (Retiga EX; QImaging, Surrey, BC, Canada), and the software provided with the BioFlux 200 device. Images were treated using the software imageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) to quantify the amount of biofilm in the microfluidic channel. The 16-bit grayscale images were adjusted with the threshold function to include the bacterial structure before particle analysis. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values.

Detection of type 1 fimbriae.

The capacity of LF82 and the *nagC* mutant to produce type 1 fimbriae was evaluated by the ability to agglutinate to *Saccharomyces cerevisiae* cells in a mannose-dependant way. As previously described [27], cultures were grown at 30°C in 20 ml of LB for 24 hours without shaking to enhance expression of type 1 fimbriae. NAG was added in the medium at a final concentration of 1 mM. The concentration of an initial suspension of approximately 2×10^{11} CFU/ml in PBS was reduced by two-fold serial dilutions in microtiter plate (Corning, 2797). An equal volume of a commercial yeast suspension in PBS 3% (wt/vol) (Fleischmann's Active Dry) was added to each well. After 30 minutes of incubation at 4°C, yeast agglutination was observable by precipitation of cells in the wells of the plate. The agglutination titer was recorded as the most diluted bacterial sample giving a positive aggregation reaction. Yeast agglutination was considered dependent of type 1 fimbriae if α -D-mannopyranose 5% (wt/vol) (Sigma-Aldrich) inhibited agglutination. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Bacteria were precultured as described in previous section. A dilution (1:100) was done in 40 ml of LB \pm NAG [1 mM] and bacteria were incubated in polystyrene petri dish overnight at 30°C. Biofilms were washed with PBS and recovered with a cell scraper. RNA was extracted from biofilm cells using Ambion® RiboPure™-Bacteria Kit (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada)), according to the manufacturer's recommendations. As described in [15], the absence of residual DNA in RNA samples was confirmed by PCR with primers targeting *rpoA*. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 10 μ g of RNA, using a reverse transcriptase and random hexanucleotide primers. A standard curve was performed to determine the copy number of targeted transcript in 50 ng of cDNA. Primers used are listed in Table S1 (Additional File 1). Results are presented as the ratios between the cDNA copy number of the gene of interest and the cDNA copy number of the housekeeping gene. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values.

Results

NAG reduces biofilm formation of AIEC strain LF82

We investigated the impact of mucus-derived sugars, including NAG, NANA and fucose, on biofilm formation of the AIEC reference strain LF82. LB culture medium was selected for optimal growth of biofilms in static condition. Upon the addition of 1mM of NAG, the SBF index of LF82 was significantly lower ($P < 0.01$) than the SBF index of LF82 grown in LB alone. Addition of NANA and fucose in the medium did not influence the biofilm formation of the strain (Fig. 1). The three mucus-derived sugars did not affect the growth of the strain after 24 hours (data not shown). A time course measurement of NAG consumption by LF82 grown in LB supplemented with 1 mM of NAG indicated that NAG was catabolized within 4 hours (Additional File 2: Figure S1).

NAG reduces specific biofilm formation of LF82 by inactivating the transcriptional regulator NagC

The regulation of AIEC strain LF82 biofilm formation by NAG was further investigated. The activity of the regulator NagC is inactivated by the presence of NAG-6-P, a catabolic derivative of NAG. Therefore, a mutant strain in *nagC* gene was created. The SBF index of LF82 Δ *nagC* mutant was significantly lower ($P < 0.05$) than the SBF index of the WT strain. This reduction of biofilm formation was similar to that observed upon the addition of NAG (Fig. 2). The wild-type phenotype was restored in the complemented strain expressing *nagC*. Interestingly, no additional repression was observed upon the addition of NAG in the Δ *nagC* mutant. This indicates that LF82 biofilm repression by NAG is NagC dependent.

NagC is involved in the first steps of biofilm formation of LF82 in presence of a shear force

To further investigate the role of NagC on biofilm formation of LF82, the dynamics of biofilm formation were monitored and visualized in real time using the BioFlux device (Fig. 3a). Real time imaging with LF82 clearly revealed the apparition of microcolonies 6 hours after the initiation of the flow. These microcolonies grow overtime and the production of polymeric matrix became more apparent at 10 hours. After 18 hours, the channel was almost entirely covered with biofilm.

At 24 hours, mature biofilms were formed. The kinetics of biofilm formation of LF82 Δ *nagC* was different from that of the WT LF82. In early time points, a reduced number of microcolonies was observed in the mutant strain. Quantification results revealed a significant ($P < 0.01$) decrease in biofilm coverage of the mutant strain when compared to the WT strain at 6 hours, 8 hours and 10 hours after the activation of the flow. At 16 hours and 18 hours, the biofilm structure of LF82 Δ *nagC* mutant was similar to that of the WT. Again, wild-type phenotype was restored in the complemented strain (Fig. 3a and 3b). This suggests that the *nagC* mutation impairs the first steps of biofilm formation of LF82 and involves surface adhesion and/or cell to cell interactions. In contrast to what we observed in static condition, supplementation of NAG did not affect biofilm formation in the microfluidic system.

The mutation of *nagC* impaired the production of type 1 fimbriae of LF82

To determine the role of type 1 pili in the NagC-dependent reduction of biofilm formation of LF82, the expression and production of type 1 fimbriae was evaluated in the mutant strain. The expression of *fimA*, encoding the major structural subunit of type 1 fimbriae, was measured in grown biofilms (Fig. 4a). Results showed a significant ($P < 0.01$) reduction of 3.5-fold of *fimA* transcription in the LF82 Δ *nagC* strain when compared to WT strain (Fig. 4a). The expression of *fimA* was restored in the complemented strain. However, the effect of supplementation of NAG in medium on the expression of *fimA* was not statistically significant but slightly increased (Fig. 4a). The production of type 1 fimbriae was measured by mannose-sensitive agglutination to *S. cerevisiae* and was significantly lower ($P < 0.01$) by 2 Log₂ in LF82 Δ *nagC* mutant in comparison to WT strain (Fig. 4b). Type 1 pili production was restored in the complemented strain. Addition of NAG during growth did not affect the production of type 1 fimbriae. Interestingly, NAG is rapidly consumed within 4 hours of bacterial growth in LB medium supplemented with NAG, as measured by mass spectrometry (additional file 2). Thus, the repressive effect of NAG on type 1 fimbriae production might be transient. Addition of mannose was previously reported to reduce the biofilm of LF82 by interfering with type 1 fimbriae adhesion (40). In presence of mannose, biofilm formation of LF82 was decreased in either LB or NAG supplemented medium indicating that type 1 fimbriae is involved in biofilm in these conditions (Additional file 3: Figure S2). Taken

together these results show that expression and production of type 1 fimbriae are regulated by NagC in LF82. Type 1 fimbriae or other structures participating to LF82 biofilm might be influenced by NAG supplementation.

The impact of mucus-derived sugars on biofilm formation varies among *E. coli* strains

Biofilm formation of a set of distinct *E. coli* strains was tested in different culture media to determine optimal conditions. LB medium was used for strains 17.2 and MG1655, whereas LBWS and M9 with glucose were the optimized culture media for biofilm formation of strains NC101 and EDL933 respectively. The effect of addition of NAG, NANA or fucose on biofilm formation was evaluated in static condition. The influence of mucus-derived sugars was variable, strain-dependent and did not affect the growth of bacteria as measured with optical density (Additional File 4: Figure S3). Our data showed that the mean OD value of biofilm formed by murine strain NC101 was significantly decreased in the presence of the all three sugars ($P < 0.01$). Supplementation of the medium with NAG ($P < 0.01$) or NANA ($P < 0.05$), significantly reduced biofilm formation of EHEC strain EDL933. A slight reduction was also observed upon the addition of NAG in EAEC strain 17.2 and K-12 strain MG1655 (Fig. 5).

Discussion

There is growing evidence that microbiota-produced metabolites can also be specifically sensed by pathogens as signals to induce or repress virulence genes [28]. We show that the mucin sugars NAG, NANA and fucose can reduce the biofilm formation of AIEC strain LF82 and other pathogenic *E. coli*. A recent study showed that fucose modulated biofilm formation of *Campylobacter jejuni* [29]. We observed that the influence of mucus-derived sugars on biofilm formation was strain-dependent, reflecting the high genetic diversity and the variability of metabolic patterns between *E. coli* strains [30, 31]. It is known that *E. coli* preference for mucus-derived sugars varies from one strain to another [10, 32, 33]. Interestingly, the repressor effect of NAG was common among the tested *E. coli* strains as NAG supplementation reduced biofilm formation of AIEC strain LF82, murine strain NC101, EHEC strain EDL933 and to a lower extent EAEC strain 17.2 and K-12 strain MG1655.

We demonstrated that the effect of NAG on biofilm formation of AIEC strain LF82 is NagC-dependent. NagC is a repressor of *nag* operon involved in catabolism of NAG in *E. coli* [34, 35]. The uptake of this sugar leads to the production of intracellular NAG-6-P that will inactivate the regulator NagC [36]. Our study shows that the inactivation of NagC, whether it is caused by the catabolism of NAG or by a mutation of *nagC*, is responsible for the decreased biofilm formation. Thus, NagC is a positive regulator of biofilm formation in LF82. Interestingly, NagC is also involved in the expression of the locus of enterocytes effacement virulence genes of EHEC as well as type 1 fimbriae of *E. coli* K-12 [13, 16, 36].

The real-time monitoring of LF82 biofilm formation using microfluidic system showed that early steps are impaired by the mutation of *nagC*. Biofilm formation initially required the attachment of the bacteria to a surface and the cell-to-cell adhesion that leads to the formation of microcolonies. Thus, during these steps, NagC might influence the expression of structures involved in early adhesion of bacteria. In contrast to the situation in static conditions, the biofilm in dynamic conditions was insensitive to the presence of NAG. It is possible that constant renewal of media in dynamic conditions influences NAG catabolism and thus NagC activity.

Type 1 fimbriae are key factors that facilitate adhesion to a surface and cell-to-cell aggregation during establishment of biofilm on abiotic surfaces [37, 38]. They also participate in biofilm formation and in the adhesion-and-invasion process in AIEC strains such as LF82 [21, 39, 40]. In the present study, we show that NagC activates the gene expression and the production of type 1 fimbriae of AIEC strain LF82. This is similar to the work showing NagC regulation on type 1 fimbriae in *E. coli* K-12 MG1655 [13]. Based on NagC consensus DNA binding site generated from known NagC binding sequences [13, 16, 41, 42], two different binding sites were found upstream of the promoter of *fimB* recombinase in LF82. *FimB* is involved in the OFF-to-ON switching of type 1 fimbriation and sequences found in LF82 were identical and in the same distance to those of *fimB* promoter in K-12 strain MG1655 [13] (Additional File 5: Figure S4). This indicates that NagC control on type 1 fimbriae could influence at least in part the biofilm formation of LF82. In contrast, NAG supplementation did not influence type 1 fimbriae production of LF82 strain. It is possible that NAG-dependant repression on type 1 fimbriae was transient because NAG is

rapidly consumed by the strain. NAG might also influence other factors contributing to biofilm formation of LF82 as NAG was also shown to influence the production of curli in *E. coli* K-12 (11).

Dysbiosis that occurs during IBD can favor AIEC growth and probably biofilm formation [43]. As glycosylation of the mucin is defective in CD [44] and microbiota activity is modified, it is possible that the availability of mucin sugars will influence not only the metabolic activity but also the virulence behavior including the pathogens' ability of biofilm formation. Thus, factors that regulate biofilm formation could signal to repress expression of the type 1 fimbriae and other factors contributing to biofilm of LF82. By affecting the concentration of free NAG available in the digestive tract, gut bacterial species expressing N-acetylglucosaminidase [6] might therefore influence *E. coli* biofilm formation through a modulation of NagC activity. Interestingly, administration of glucosamine can reduce production of pro-inflammatory cytokines and therefore intestinal inflammation in murine model of IBD could influence the activity of the flora including AIEC and reduce their biofilm formation and colonization ability [45, 46].

Conclusion

In conclusion, the presence of mucin-derived sugars can influence biofilm formation of different *E. coli* strains. This study highlights that the diminution of biofilm formation of AIEC strain LF82 in the presence of NAG is NagC-dependent. Indeed, the NAG sensor NagC is involved in the early steps of biofilm formation of strain LF82 and its implication could be partly due to the control of type 1 fimbriae.

Additional Files

Additional File 1: Table S1. List of primers used in this study

Additional File 2: Figure S1. Monitoring of NAG consumption by LF82 WT, LF82 Δ nagC and the complemented strain when grown under static condition. Concentration of NAG was measured by mass spectrometry.

Additional File 3: Figure S2. Specific biofilm formation of LF82 was evaluated in the presence or absence of mannose in either in LB or LB supplemented with NAG.

Additional File 4: Figure S3. The effect of the addition of mucus-derived sugars on growth of strains.

Additional File 5: Figure S5. NagC consensus DNA binding sites and nucleotide BLAST of LF82 and MG1655.

Abbreviations

AIEC: adherent and invasive *E. coli*; NAG: N-acetyl-glucosamine; InPEC: intestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC: extra-intestinal pathogenic *E. coli*; IBD: inflammatory bowel disease; CD: Crohn's disease; NANA: N-acetylneuraminic acid; EHEC: enterohemorrhagic *E. coli*; LB: lysogeny broth; EAEC: enteroagregative *E. coli*; LBWS: LB without salt; PBS: phosphate-buffered saline; OD: optical density; SBF: specific biofilm formation; cDNA: complementary DNA.

Authors' contributions

The experiments were performed mainly by JFS with the help of PV. JFS and JH performed the data analysis. The study was designed by JH, JFS, GLB and PV. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2.

²Regroupement de Recherche Pour un Lait de Qualité Optimale (Op+Lait), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2.

Acknowledgements

We thank Joan Pena and Yaindrys Rodriguez Olivera for their help with qRT-PCR assays. We also thank Jean-Charles Côté for proofreading the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was supported by a Team grant from the Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies (FRQNT PT165375), to JH, MJ and FB and by the Discovery grant program of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2015-05373 to JH and RGPIN-2016-04203 to MJ). JFS is a recipient of a scholarship from the NSERC Collaborative Research and Training Experience Program in Milk Quality; and PV is a recipient of a scholarship from the FRQNT Québec Wallonie program.

References

1. Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Krogfelt KA: Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun* 1994, 62(11):5191-5194.
2. Torres AG, Zhou X, Kaper JB: Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 2005, 73(1):18-29.
3. Darfeuille-Michaud A: Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 2002, 292(3-4):185-193.
4. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF: High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127(2):412-421.
5. Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ: *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014, 5(3):213-227.
6. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI: Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 2008, 4(5):447-457.
7. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, Cohen PS, Conway T, Forano E, Martin C: Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 2013, 15(2):610-622.
8. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM et al: Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 2013, 502(7469):96-99.
9. Conway T, Cohen PS: Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 2015, 3(3).
10. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, McHargue JW, Hightower GA, Smith JT, Autieri SM et al: Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 2008, 76(3):1143-1152.
11. Barnhart MM, Lynem J, Chapman MR: GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006, 188(14):5212-5219.
12. Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, Sperandio V: Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 2012, 492(7427):113-117.
13. Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA, Blomfield IC: Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(46):16322-16327.
14. Vogt SL, Pena-Diaz J, Finlay BB: Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 2015, 34:106-115.

15. Le Bihan G, Jubelin G, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Martin C, Beaudry F, Harel J: 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* 2015, 17(1):23-33.
16. Le Bihan G, Sicard JF, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Gobert AP, Garrivier A, Martin C, Hay AG, Beaudry F, Harel J et al: The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 2017, 7:134.
17. Bollinger RR, Barbas AS, Bush EL, Lin SS, Parker W: Biofilms in the normal human large bowel: fact rather than fiction. *Gut* 2007, 56(10):1481-1482.
18. Bollinger RR, Everett ML, Wahl SD, Lee YH, Orndorff PE, Parker W: Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. *Mol Immunol* 2006, 43(4):378-387.
19. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S: In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006, 188(10):3572-3581.
20. Rossi E, Cimdins A, Luthje P, Brauner A, Sjolting A, Landini P, Romling U: "It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol* 2017:1-30.
21. Martinez-Medina M, Naves P, Blanco J, Aldeguer X, Blanco JE, Blanco M, Ponte C, Soriano F, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil LJ: Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 2009, 9:202.
22. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H: Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7):3380-3389.
23. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A: Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 2009, 60 Suppl 6:61-71.
24. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR: A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 1991, 109(1):137-141.
25. Tremblay YD, Vogeleer P, Jacques M, Harel J: High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81(8):2827-2840.
26. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodriguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F: Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* 2008, 105(2):585-590.
27. Vogeleer P, Tremblay YD, Jubelin G, Jacques M, Harel J: Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Appl Environ Microbiol* 2015, 82(5):1448-1458.
28. Baumler AJ, Sperandio V: Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016, 535(7610):85-93.
29. Dwivedi R, Nothaft H, Garber J, Xin Kin L, Stahl M, Flint A, van Vliet AH, Stintzi A, Szymanski CM: L-fucose influences chemotaxis and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 2016, 101(4):575-589.

30. Baumler DJ, Peplinski RG, Reed JL, Glasner JD, Perna NT: The evolution of metabolic networks of *E. coli*. BMC Syst Biol 2011, 5:182.
31. Meador JP, Caldwell ME, Cohen PS, Conway T: *Escherichia coli* pathotypes occupy distinct niches in the mouse intestine. Infect Immun 2014, 82(5):1931-1938.
32. Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS et al: Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101(19):7427-7432.
33. 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(1):e53957.
34. Plumbridge J, Kolb A: CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *Escherichia coli*. J Mol Biol 1991, 217(4):661-679.
35. Plumbridge J, Kolb A: DNA loop formation between Nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of *Escherichia coli* in vivo. Mol Microbiol 1993, 10(5):973-981.
36. El Qaidi S, Plumbridge J: Switching control of expression of ptsG from the Mlc regulon to the NagC regulon. J Bacteriol 2008, 190(13):4677-4686.
37. Schembri MA, Christiansen G, Klemm P: FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2001, 41(6):1419-1430.
38. Pratt LA, Kolter R: Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 1998, 30(2):285-293.
39. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A: Regulatory and functional cooperation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. Mol Microbiol 2003, 48(3):781-794.
40. Nickerson KP, McDonald C: Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin. PLoS One 2012, 7(12):e52132.
41. El Qaidi S, Allemand F, Oberto J, Plumbridge J: Repression of galP, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. Mol Microbiol 2009, 71(1):146-157.
42. Plumbridge J: 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 1995, 14(16):3958-3965.
43. Agus A, Massier S, Darfeuille-Michaud A, Billard E, Barnich N: Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. Biomed Res Int 2014, 2014:567929.
44. Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP: Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. Int J Clin Pract 2008, 62(5):762-769.
45. Azuma K, Osaki T, Kurozumi S, Kiyose M, Tsuka T, Murahata Y, Imagawa T, Itoh N, Minami S, Sato K et al: Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. Carbohydr Polym 2015, 115:448-456.

46. Bak YK, Lampe JW, Sung MK: Effects of dietary supplementation of glucosamine sulfate on intestinal inflammation in a mouse model of experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014, 29(5):957-963.
47. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF et al: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997, 277(5331):1453-1462.
48. Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA et al: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001, 409(6819):529-533.
49. Rich C, Favre-Bonte S, Sapena F, Joly B, Forestier C: Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 173(1):55-61.
50. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB: Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005, 128(4):891-906.
51. Roland K, Curtiss R, 3rd, Sizemore D: 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* 1999, 43(3):429-441.
52. Amann E, Ochs B, Abel KJ: Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988, 69(2):301-315.

Figures & Tables

Figure 1. Impact of mucus-derived sugars on specific biofilm formation of AIEC strain LF82.

Biofilms of strain LF82 were formed in LB medium under static conditions at 30°C. NAG, NANA or fucose were supplemented at a concentration of 1mM. SBF values are the mean and standard error of at least 3 biological experiments. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test **, $P < 0.01$.

Figure 2. NagC positively influences the biofilm formation of AIEC strain LF82.

Biofilms of strain LF82, its isogenic mutant $\Delta nagC$ and complemented $\Delta nagC$ were formed in LB medium under static condition at 30°C. NAG was supplemented at a concentration of 1mM. SBF values are the mean and standard error of 4 biological replicates. Statistical analysis was calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Figure 3. The biofilm formation is delayed in *nagC* mutant of LF82 in a microfluidic system.

(A) Biofilms of strain LF82, its isogenic mutant $\Delta nagC$ and complemented $\Delta nagC$ were formed in LB medium at 30°C in the BioFlux 200 microfluidic system. NAG was supplemented at a concentration of 1 mM. A field of view representative of 3 independent replicates is shown for each test. Images were captured by phase contrast microscopy using a digital camera. (B) Quantification of biofilm formation was made using the "Analyze Particles" function of ImageJ and results show the percentage of the area covered by biofilm structures in images pictures. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Figure 4. NagC influences the expression and the production of type 1 fimbriae of LF82. (A) The expression of type 1 fimbriae subunit *fimA* was measured by qRT-PCR in LF82 WT strain, its Δ *nagC* derivatives and the complemented mutant grown as biofilm in LB media. NAG was also supplemented at a concentration of 1mM in media used for WT strain. Results are shown as the ratio of copy number of *fimA* transcript / copy numbers of *tufA* transcript. (B) Production of type 1 fimbriae was also evaluated for each strain by mannose specific agglutination to the yeast *S. cerevisiae*. LB medium was used in the experiments and NAG was supplemented at a concentration of 1 mM when needed. Results are the mean values and standard error of 3 biological experiments. Statistical analyzes were made using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Figure 5. Mucus-derived sugars can influence the specific biofilm formation of different strains of *E. coli*. Strain specific optimized conditions for biofilm formation were identified. LB was used for EAEC strain 17.2 and K-12 strain MG1655. LBWS was used for AIEC strain NC101 and M9 with glucose was used for EHEC strain EDL933. Biofilms were formed under static conditions at 30°C except for strain EDL933 that was grown at 37°C. NAG, NANA and fucose were supplemented at a concentration of 1mM. SBF values are the mean and standard error of at least 3 biological experiments. Statistical analysis was made using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

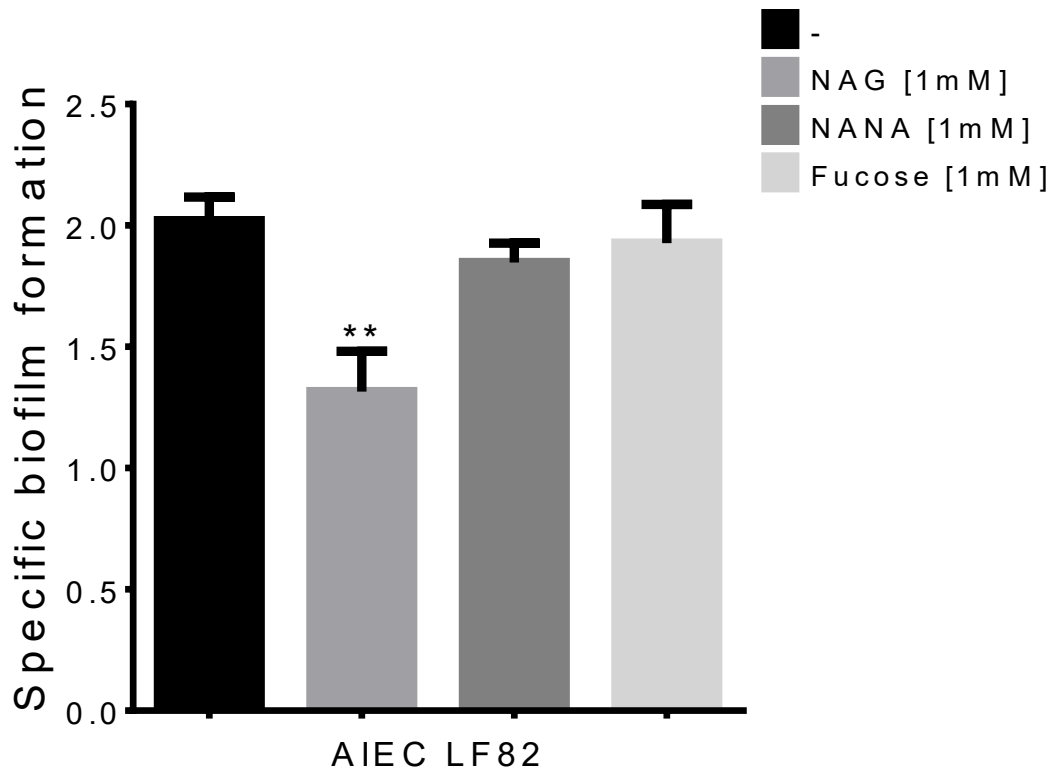


Figure 1.

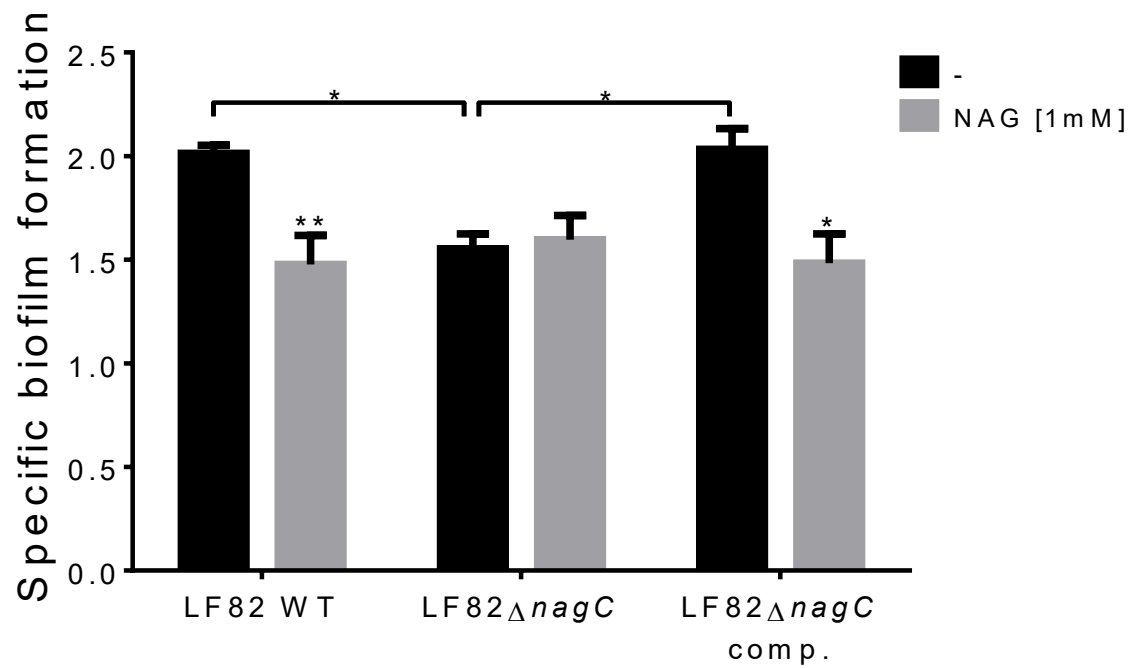
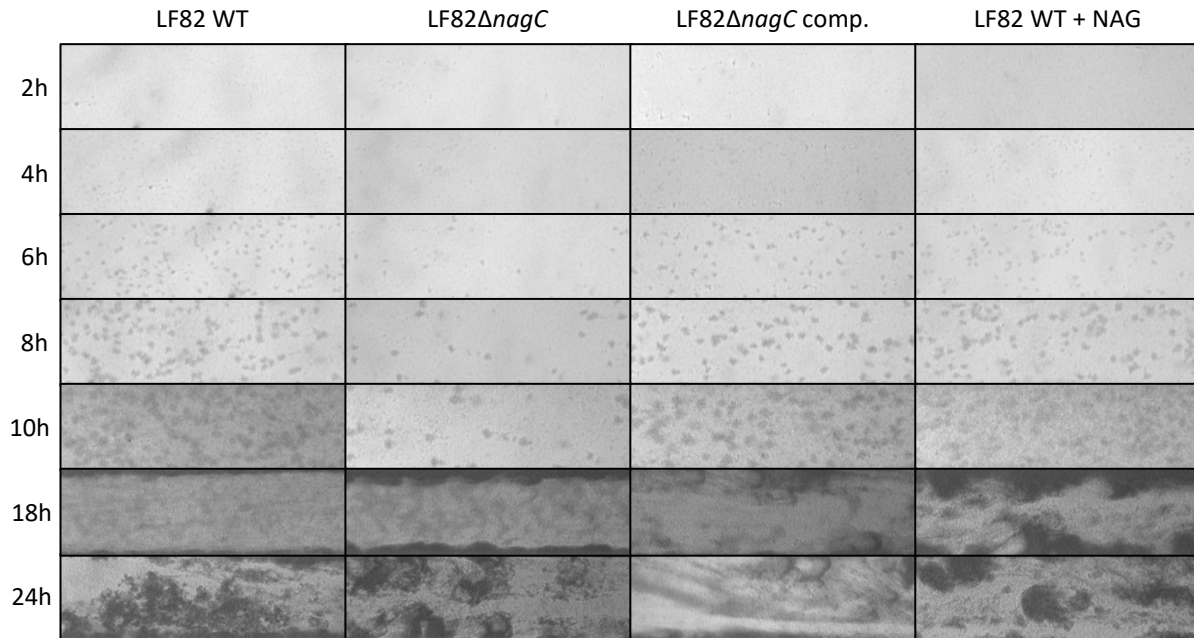


Figure 2.

A



B

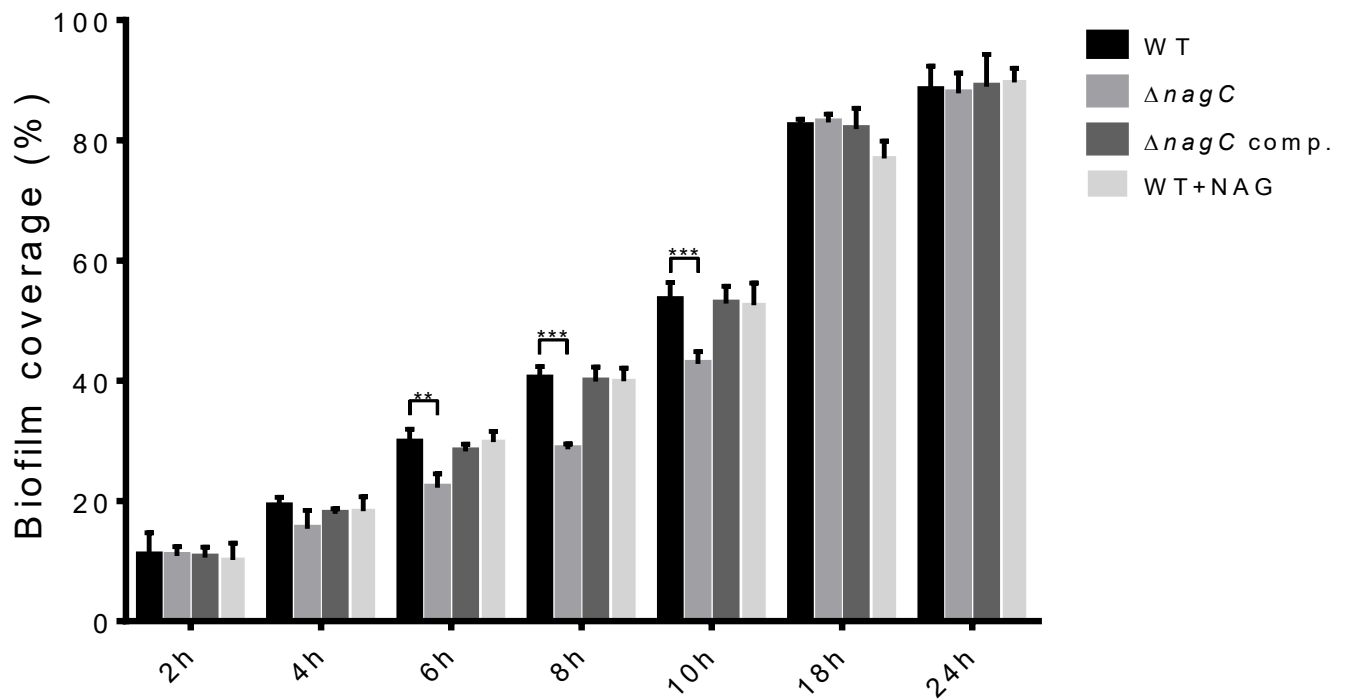


Figure 3.

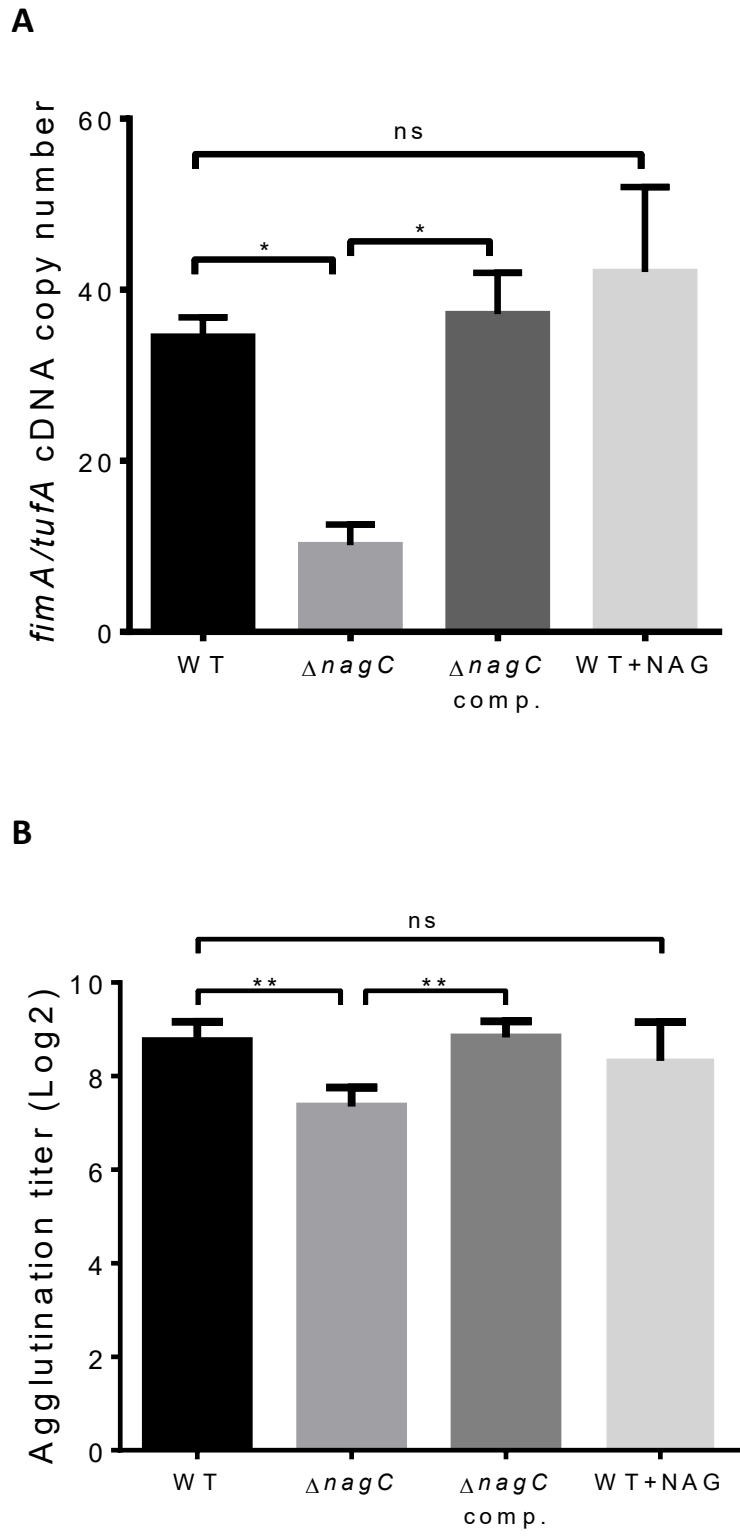


Figure 4.

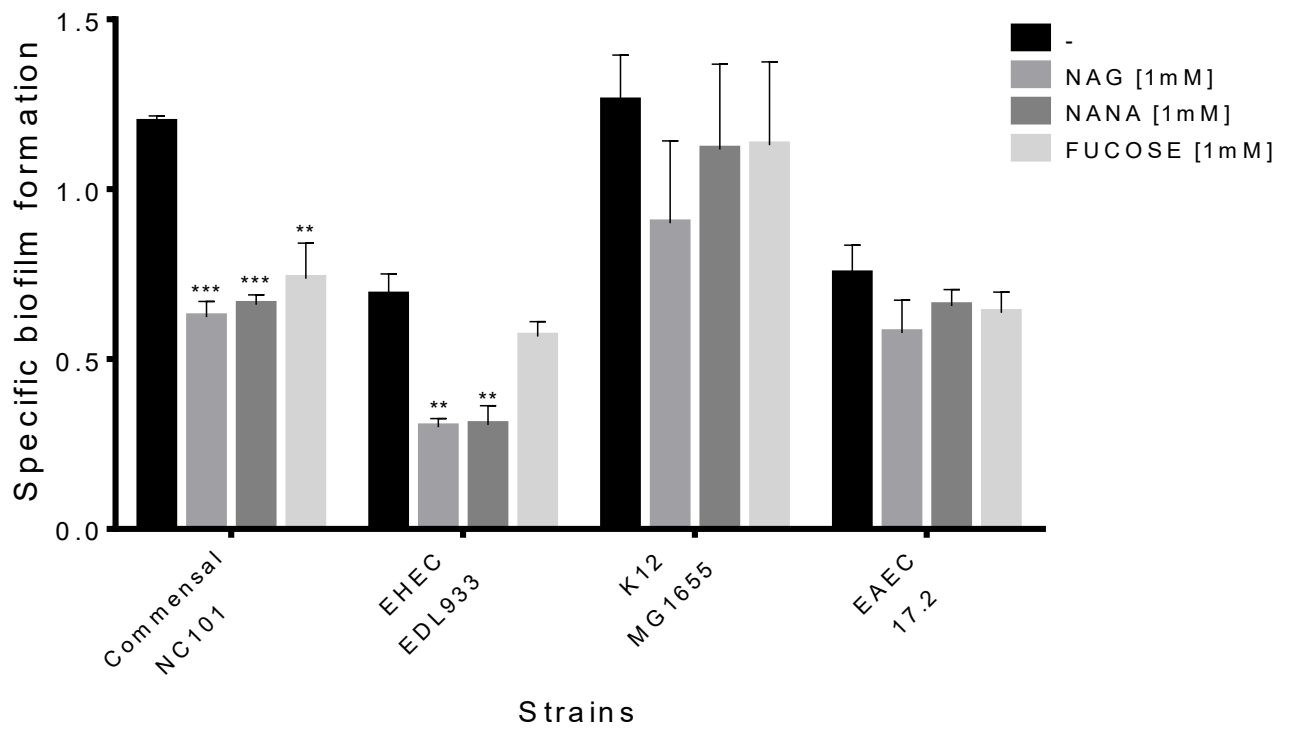


Figure 5.

Table 1. List of strains and plasmids used in this study

Strains	Characteristics	Origin	Disease	References
LF82	Wild type AIEC O83:H1 Amp ^R	Human	Crohn's disease	[4]
LF82 Δ <i>nagC</i>	LF82 Δ <i>nagC</i> Amp ^R Kan ^R			This study
MG1655	Laboratory <i>E. coli</i> K-12	Human	Healthy	[47]
EDL933	Wild type EHEC O157:H7	Human	Diarrhea, HUS	[48]
17.2	Wild type EAEC	Human	Diarrhea	[49]
NC101	Wild type Commensal (AIEC-like)	Mouse	Mouse colitis	[50]
χ7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 glnV44 fhuA21 lacY1 recA1</i> <i>RP4-2-Tc::Mu λpir ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10</i>			[51]
Plasmids	Characteristics			References
pGEM [®] -T	Cloning vector			Promega Corp., Madison, WI, USA
pMEG-375	Suicide vector <i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> ; Cm ^R Ap ^R			Roy Curtiss III, Arizona State University, Tempe, AZ, USA
pΔ<i>nagC</i>	pMEG-375 with Δ <i>nagC</i> :: Km ^R			[16]
pTrc99a	expression vector with IPTG inducible <i>lacI</i> promoter; Ap ^R			[52]
<i>pnagC</i>	pTrc99a with <i>nagC</i>			[16]
<i>pnagC</i> -JFS	<i>pnagC</i> with Cp ^R			This study

Additional files

Additional file 1

Table S1. List of primers used in this study.

Names	Sequence 5' → 3'	Use
M- <i>tufA</i> -For	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	Standard curve
M- <i>tufA</i> -Rev	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	Standard curve
q- <i>tufA</i> -For	GTGAAGAAATCGAACGTG	qRT-PCR
q- <i>tufA</i> -Rev	TTCAATGGTACCAGTCAC	qRT-PCR
M- <i>fimA</i> -For	CTCTGTCCCTGAGTTCTACA	Standard curve
M- <i>fimA</i> -Rev	ATTAGCAGCACCTGGGGTTG	Standard curve
q- <i>fimA</i> -For	GGCTCTGTTGATCAAACCGT	qRT-PCR
q- <i>fimA</i> -Rev	CCGAGCTGAACTCTGTAGA	qRT-PCR
<i>nagC</i> -aval-For	ACTTTCTTATTGAGTTACGACCTCGTTA	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -amont-Rev	TGTGCTTTTATAGTGCGCTTATTGTTGTC	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>Ascl-nagC</i> -For	AGGCGCGCCTACCGCGCCCGTGGGTGTCCG	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>Sacl-nagC</i> -Rev	CGAGCTCGGCGATGCCGTATATTACCGG	Construction of <i>nagC</i> mutant
H2P2- <i>nagC</i> -For	AGCGCCACTATAAAAGCACAtgtaggctggagctgcttcg	Construction of <i>nagC</i> mutant
H1P1- <i>nagC</i> -Rev	GTA ACTCAATAAGAGAAAAGTattccggggatccgtcgacc	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -comp-For- <i>Sacl</i>	CGAGCTCGTAACGAGGTCGTA ACTCAAT	<i>nagC</i> mutant complementation
<i>nagC</i> -comp-Rev-BamHI	CGGGATCCC GCGCCACTATAAAAGCACAT	<i>nagC</i> mutant complementation

Additional file 2

Mass Spectrometry

The concentrations of NAG were determined using a High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution, Accurate-Mass Mass Spectrometry (HPLC-HRAM MS) assay. 50 μL of samples were mixed with 500 μL of internal standard solution (100 μM of stable isotope labeled products of NAG). The samples were then vortexed vigorously and centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μL of the supernatant was transferred into an injection vial. Ten μL of samples were injected with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system (San Jose, CA, USA) onto a Thermo Biobasic C18 5 x 1 mm column (5 μm) with a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and 20 mM ammonium acetate aqueous solution ($\text{pH} \approx 7.0$) at ratio of 50:50. The Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) mass spectrometer (Concord, ON, Canada) interfaced with the HPLC system used a pneumatic assisted electrospray ion source operating in positive ion modes. Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec in targeted SIM mode. Ion were extracted using accurate mass of the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion with a ± 5 ppm window for NAG and $^{13}\text{C}_2$ -NAG. The peak area ratios of the light- and heavy-isotopic pairs were used for quantification.

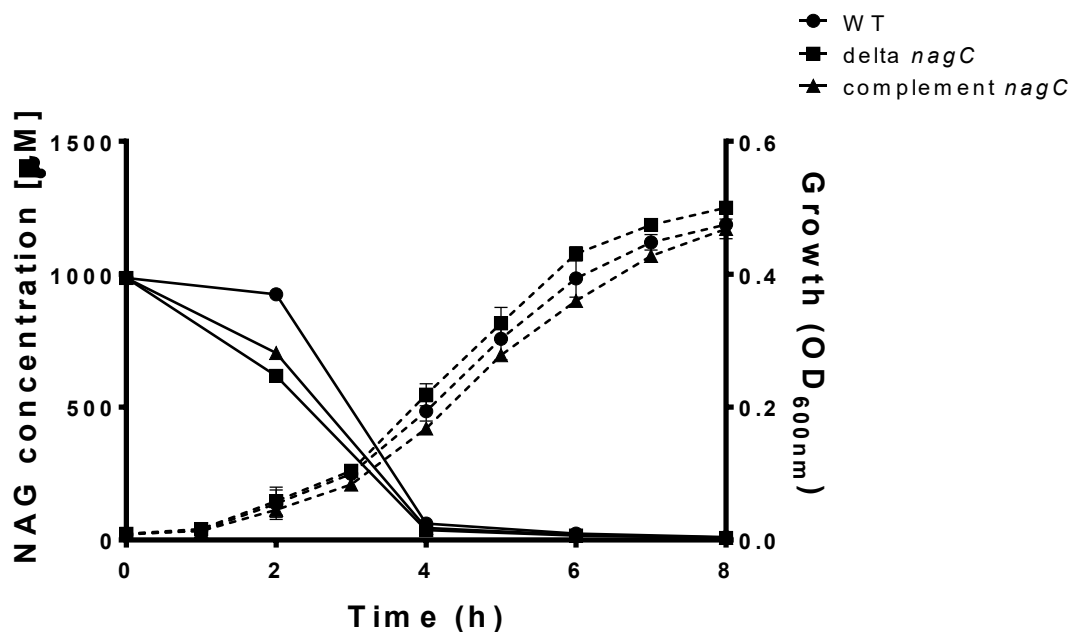


Figure S1. Monitoring of NAG consumption by LF82 WT, LF82 Δ *nagC* and the complemented strain when grown under static condition. Strains were incubated at 30°C in LB media containing 1 mM of NAG. Samples of media were taken and filtered at different time points. Concentration of NAG was measured by HPLC-SRM MS. Growth was evaluated by optical density at 600nm.

Additional file 3

The effect of competition with mannose

Specific biofilm formation of LF82 was evaluated in the presence or absence of mannose in either in LB or LB supplemented with NAG. Statistical analysis was made using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

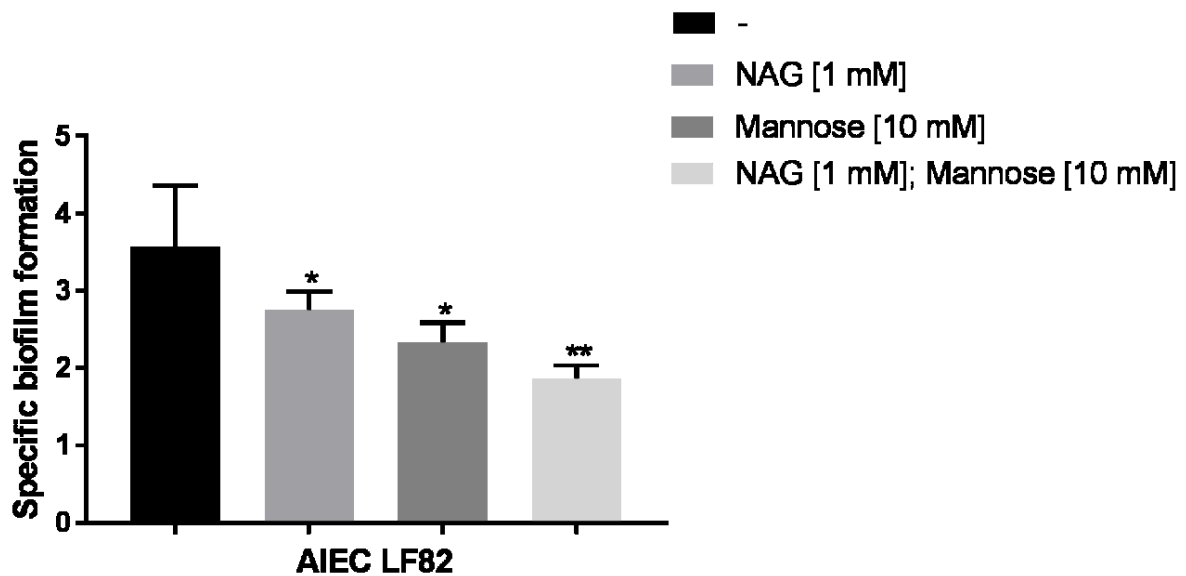


Figure S2. The effect of competition with mannose is similar to the addition of NAG on the reduction of the biofilm formation of LF82. Type 1 pili attach to cells and surfaces in a mannose-sensitive manner. Competition with mannose reduced specific biofilm formation by LF82 in LB to a level similar to that of NAG supplemented medium.

Additional file 4

Evaluation of growth

Growth of strains was evaluated in the same media used for biofilm formation. Overnight cultures were diluted (1/100) in 5 ml of fresh media containing 1mM of different mucus-derived sugars. A volume of 200 μ l was transferred in polystyrene 96 well plate and incubated under static condition at 30°C with the exception of EDL933 at 37°C. OD values are the mean and standard error of at least 3 biological experiments. Statistical analysis was made using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

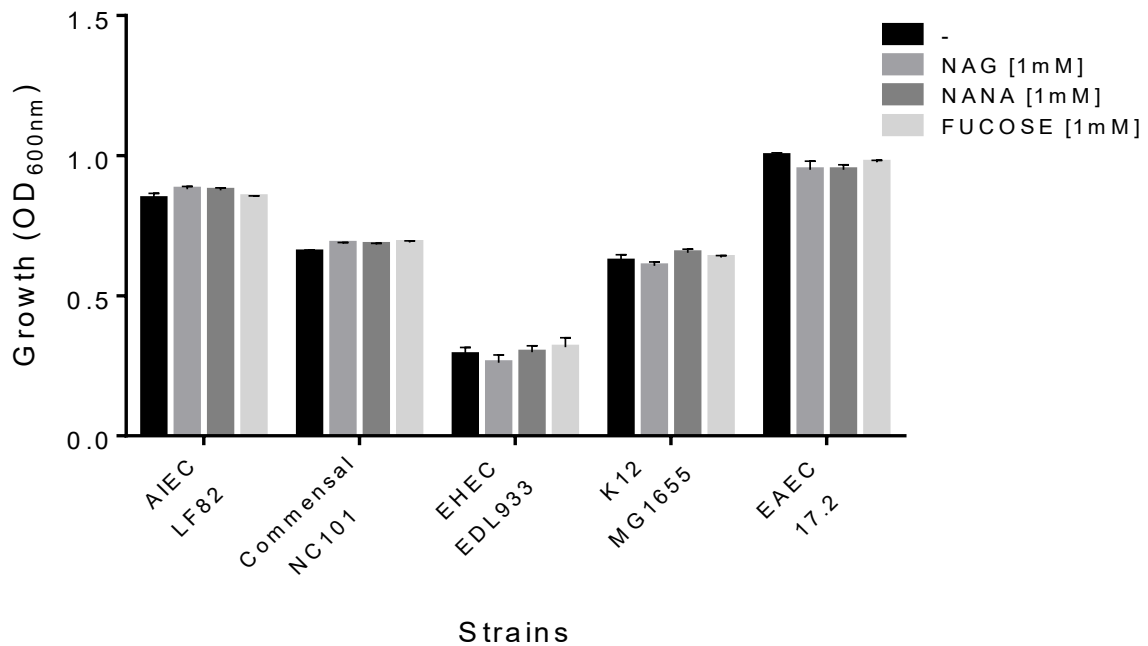


Figure S3. The effect of the addition of mucus-derived sugars on growth of strains.

Additional file 5

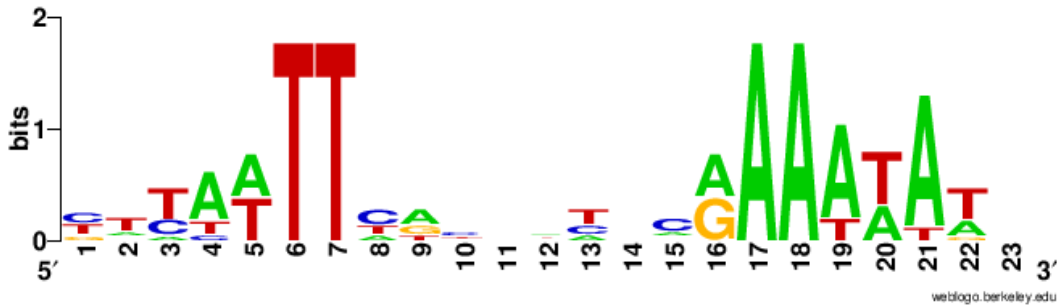


Figure S4. NagC consensus DNA binding site generated by Weblogo from known NagC binding sequences [13, 16, 41, 42].

Two different binding sites were found upstream of the promoter of *fimB* recombinase in LF82. These sequences were identical to those of *fimB* promoter described in K-12 strain MG1655 [13]. BLAST was generated from NCBI.

```

LF82      AAGTGATGTTTGCCATAGATTGCGAGATGCCCTGTCTCATTGACTATCGCGGTGCACCTT
          |||
MG1655    AAGTGATGTTTGCCATAGATTGCGAGATGCCCTGTCTCATTGACTATCTTGGTGCACCTT

LF82      TATACCTGTTTATACCAGATCAAAAATCACGCAATCCATACAACAAAACGAGATTGCAAT
          |||
MG1655    TATACCTGTTTATACCAGATCAAAAATCACGCAATCCATACAACAAAACGAGATTGCAAT

LF82      TCGTGTCAAAAATATGTCGATCTTTTTCTAAGAGGAAGATGCCATGTGAAGCCAGACGA
          |||
MG1655    TCGTGTCAAAAATATGTCGATCTTTTTCTAAGAGGAAGATGCCATGTGAAGCCAGACGA

LF82      ACACTTGCGGTGGTCTTCAAAAATAAAGGCATTCTTTTAACTATTTGTTTTATAAATGA
          |||
MG1655    ACACTTGCGGTGGTCTTCAAAAATAAAGATCTTAGTTTAACTATTTGTTTTATAAATAA

LF82      TTTATTTGGGGTCTAAACAAGGGAAGCTTTGCAAGCTAGCTCAGTGAGCGTGGTGAAAAT
          |||
MG1655    TTTATTAAGAGTCTAAACAAGGGGAGCTTTGCAAGCTAACTCAGTGAGCTTGGTGAAAAT

LF82      AAGTGTTTACCCGCCATCAGGCTGATCATAATTCTCATCATGAAATATGTTTCCTGGTTT
          |||
MG1655    CAGTGTTTACCCGCCATCAGGCTGAGCATAATTCTCATCATGAAATATGTTTCCTGGTTT

LF82      TTGGCTTGTAAGTGGTCACCCCTGAAGTCGATCTGGAAAGGCTTGTAGATGTTGGTGTTT
          |||
MG1655    GTGGCTTGTAAGTGGTCACTTCTGAAGTCGATCTGGAGAGGCTTGTGATGTTGGTGTTT
    
```