

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Identification des gènes de *Escherichia coli* entérohémorragique
exprimés pendant l'infection de macrophages humains**

par
Katherine Poirier

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de
M.Sc. en Microbiologie et Immunologie

Octobre, 2007

© Katherine Poirier, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Identification des gènes de *Escherichia coli* entérohémorragique
exprimés pendant l'infection de macrophages humains**

présenté par :

Katherine Poirier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre France Daigle
Directrice de recherche

Dre Josée Harel
Codirectrice de recherche

RÉSUMÉ

La bactérie *Escherichia coli* O157:H7 est une souche pathogène humaine entérique émergente responsable de la « maladie du hamburger ». Dans l'intestin, elle adhère spécifiquement à l'épithélium recouvrant les follicules lymphatiques où le risque de rencontre avec les cellules du système immunitaire est très grand. Notre hypothèse est que la bactérie *E. coli* O157:H7 peut survivre dans les macrophages humains pour se protéger du système immunitaire et ainsi augmenter sa persistance dans l'organisme. La souche séquencée EDL933 ainsi que la lignée de macrophages humains THP-1 ont été utilisées afin d'étudier l'interaction entre les bactéries et les macrophages.

Le premier objectif était de déterminer la capacité de survie de la bactérie dans les macrophages humains. Les macrophages ont été infectés avec *E. coli* O157:H7 et les taux de survie ont été déterminés pour divers temps intracellulaires. La survie a aussi été évaluée avec l'aide de la cytométrie en flux et de la microscopie à fluorescence grâce à une souche *E. coli* O157:H7 GFP positive. La bactérie survit après 24 heures dans les macrophages et se multiplie.

Le deuxième objectif était d'obtenir le profil transcriptomique de *E. coli* O157:H7 en contact avec les macrophages humains afin de mieux comprendre la réponse de la bactérie dans cet environnement. La technique de SCOTS a été couplée avec l'hybridation de biopuces permettant une analyse globale de la transcription génique. L'expression des gènes pendant l'infection de macrophages a été comparée avec celle d'une condition contrôle afin de déterminer les gènes surexprimés ou réprimés dans les macrophages. La transcription de gènes de résistance à l'acidité extrême et de gènes de résistance à l'oxide nitrique était surexprimée, de même que celle de certains systèmes de capture du fer et des sous-unités B des Shiga toxines.

Ce projet a permis d'obtenir le transcriptome global d'une bactérie extracellulaire à l'intérieur des macrophages humains ouvrant la porte à l'amélioration de la compréhension des réactions bactériennes face à cet environnement. De plus, la survie ainsi que la multiplication de *E. coli* O157:H7 ont été observées à l'intérieur des macrophages, ce qui constitue une nouveauté extrêmement intéressante.

Mots clés : bactérie, macrophage humain, transcriptome, biopuce, Shiga toxine,

Escherichia coli O157:H7

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is an emergent human pathogen causing the “hamburger disease”. In the intestine, the bacteria bind to the follicle associated epithelium where the risk of meeting macrophages is high. Our hypothesis is that the bacteria *E. coli* O157:H7 can survive in humans macrophages to hide from the immune system and increase its persistence in the host. The sequenced strain EDL933 and the human macrophages THP-1 were used to study the interaction between *E. coli* O157:H7 and human macrophages.

The first objective was to determine the survival capacity of the bacteria in human macrophages. The macrophages were infected with the bacteria and survival level was determined for several intracellular times. Flux cytometry and fluorescence microscopy are also used to evaluate the survival with a GFP positive *E. coli* strain. *E. coli* O157:H7 survived after 24 hours in human macrophages and it can also multiply.

The second objective was to obtain the transcriptional profile of *E. coli* O157:H7 in the human macrophages in order to understand the bacterial response toward the new environment. The SCOTS technique as well as the hybridation of biopuce were used to obtain a global analysis of genome transcription. The gene expression during the infection was compared to the one from a control condition to determine the up-regulated or down-regulated genes in human macrophages. Acidity resistance genes as well as nitric oxide resistance genes, some iron transport genes and subunit B genes from Shiga toxins were up-regulated.

This project is of great importance and allows us to obtain the global transcriptome of an extracellular bacteria in contact with human macrophages. It contributes to the improvement of the knowledge related to the bacterial responses in this particular environment. Furthermore, the survival as well as the multiplication of *E. coli* O157:H7 was observed inside human macrophages which is extremely important and was unknown until now.

Key words : bacteria, human macrophage, transcriptome, microarray, Shiga toxin,

Escherichia coli O157:H7

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	v
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1 SOURCE D'INFECTION, MALADIE, PRÉVENTION ET TRAITEMENT	2
1.2 L'ÉVOLUTION DE <i>E. COLI</i> O157:H7	4
1.3 LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE	8
1.3.1 La résistance à l'acidité	9
1.3.2 L'adhésion	10
1.3.2.1 Les fimbriae.....	10
1.3.2.1.1 <i>Type 1</i>	11
1.3.2.1.2 <i>Curli</i>	12
1.3.2.1.3 <i>Lpf1 et Lpf2</i>	12
1.3.2.1.4 <i>F9</i>	13
1.3.2.1.5 <i>Ecf</i>	13
1.3.2.2 Les adhésines.....	15
1.3.2.3 L'attachement intime.....	16
1.3.2.3.1 <i>Description du LEE</i>	16
1.3.2.3.2 <i>Régulation de l'expression du LEE</i>	17
1.3.2.3.3 <i>Établissement de l'attachement intime</i>	19
1.3.2.3.4 <i>Autres effecteurs et fonctions</i>	21
1.3.3 Les Shiga toxines	22
1.3.3.1 Apport dans la maladie.....	22
1.3.3.2 Structure, sécrétion et mode d'action.....	23
1.3.3.3 Régulation.....	25
1.3.4 Le plasmide pO157	27
1.3.5 Les îlots de pathogénicité	30
1.3.6 L'approvisionnement en fer	31

1.3.6.1 Les perméases	32
1.3.6.2 Les sidérophores	33
1.3.6.3 Hème et hémoglobine comme source de fer	34
1.3.6.4 Autres systèmes transportant le fer	36
1.4 LES ÉTUDES D'EXPRESSION GÉNIQUE <i>IN VIVO</i>	36
1.4.1 STM, IVET et IVIAT	37
1.4.1.1 «Signature-tagged mutagenesis» (STM).....	37
1.4.1.2 « <i>In vivo</i> expression technology» (IVET)	38
1.4.1.3 « <i>In vivo</i> induced antigen technology» (IVIAT).....	39
1.4.2 « Selective capture of transcribed sequences » (SCOTS)	40
1.4.3 Biopuces	42
2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	44
3. PUBLICATION	45
3.1 ABSTRACT	487
3.2 INTRODUCTION	48
3.3 RESULTS	49
3.4 DISCUSSION	52
3.5 MATERIALS AND METHODS	56
4. DISCUSSION	74
4.1 MISE EN CONTEXTE	74
4.2 SURVIE ET MULTIPLICATION INTRACELLULAIRES	76
4.3 ADHÉSION ET RÉSISTANCE À L'ACIDITÉ	76
4.4 SHIGA TOXINES	78
4.5 PLASMIDE PO157 ET ÎLOTS O	80
4.6 L'APPROVISIONNEMENT EN FER	82
5. CONCLUSION	84
6. RÉFÉRENCES	86

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma de l'évolution des EHEC (Wick, 2005)
- Figure 2: Adhérence de *E. coli* sur des cellules Hep-2 grâce au fimbriae Ecf (visualisation en microscopie électronique, Rendon, 2007)
- Figure 3 : Visualisation d'un SST3 purifié et d'un schéma de SST3 indiquant les différentes sous-unités nécessaires à sa construction (Marlovits, 2004; Garmendia, 2005)
- Figure 4: Organisation du LEE et régulation de celui-ci par des gènes du LEE et d'autres gènes (adapté de Elliott, 2000)
- Figure 5 : Attachement intime d'une EPEC sur des cellules intestinales (site internet de Bret Finlay)
- Figure 6 : Crystal de la toxine Stx1 de *Shigella* (Fraser, 1994)
- Figure 7 : Niveau d'ARNm de Gb3 dans les tissus humains (Normalisé par rapport au niveau du cœur) (Kojima, 2000)
- Figure 8: Plasmide de virulence pO157 (adapté de Blattner, 1998)
- Figure 9: Technique de SCOTS (adapté de Graham, 1999)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AEEC	«Attaching and effacing <i>E. coli</i> »
AFI	«Acid fitness island »
Ap	Ampicilline
AR	Résistance à l'acide
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
b	bases
°C	Degré Celsius
CFU	Unité formatrice de colonie
C_t	« Threshold cycle »
DAEC	« Diffuse adherent <i>E. coli</i> »
DOC	Acide déoxycholique
DMEM	« Dubelcco's modified Eagle's medium »
EaggEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégative
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasive
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogénique
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigénique
EtOH	Ethanol
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinale
FAE	« Follicle associated epithelium medium »
Fe ²⁺	Fer ferreux
FCS	Serum de veau foetal
GFP	Protéine fluorescente verte

HEPES	Acide <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonique
IgG	Immunoglobines G
IVET	« <i>In vivo</i> expression technology »
IVIAT	« <i>In vivo</i> induced antigen technology »
IVOC	« <i>In vitro</i> organ culture »
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
Kn	Kanamycine
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate dehydrogenase
LEE	«Locus of enterocytes effacement »
LiCl	Chlorure de lithium
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molaire
Mb	Mégabases
Mg ²⁺	Magnésium
Mn ²⁺	Manganèse
MEM	«Modified Eagle's medium »
MENEC	<i>E. coli</i> causant des méningites
min	Minute
ml	Millilitre
MLEE	«Multi-locus enzyme electrophoresis »
mM	Millimolaire
MOI	«Multiplicity of infection »
NaCl	Chlorure de sodium
NFEC	<i>E. coli</i> de la flore normale
OI	Ilot O «O island»
OMP	Protéine de la membrane externe
ORF	Cadre de lecture ouvert
PBS	« Phosphate buffered saline »
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase

PI	Ilot de pathogénicité
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTT	Purpura thrombotique thrombocytopénique
qPCR	«Quantitative real-time PCR »
RDEC	<i>E. coli</i> de lapin diarrhégenique
RPMI	«Roswell Park Memorial Institute»
SCOTS	«Selective Capture Of Transcribed Sequences »
SCV	Vacuole contenant <i>Salmonella</i>
SHU	Syndrome hémolytique urémique
SPI	Ilot de pathogénicité de <i>Salmonella</i>
STEC	<i>E. coli</i> produisant des Shiga toxines
SST3	Système de sécrétion de type 3
STM	«Signature-tagged mutagenesis »
TBST	«Tris buffered saline with tween »
T2SS	Système de sécrétion de type II
T3SS	Système de sécrétion de type III
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogénique
VTEC	<i>E. coli</i> comprenant les vérotoxines

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les chercheurs m'ayant accueillie dans leur laboratoire. Roland Brousseau, de l'Institut de Recherche en Biotechnologie de Montréal, m'a permis d'effectuer une partie de mes recherches dans son laboratoire. Le matériel mis à ma disposition a été très important pour l'obtention de mes résultats. Je remercie aussi l'ensemble de son équipe pour leur accueil chaleureux, et particulièrement Claudie avec qui j'ai partagé mon espace de travail. Je remercie aussi Josée Harel, ma codirectrice du département de Pathologie et Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, pour l'accueil dans son laboratoire, ainsi que ses nombreux conseils lors de la rédaction de mon mémoire. Plus particulièrement, je tiens à remercier Guillaume Bruant, étudiant postdoctoral dans ce laboratoire pour son soutien constant et ses nombreuses offres de covoiturage.

Évidemment, je remercie mes collègues de laboratoire et les nombreux stagiaires ayant travaillé chez France Daigle. Un merci tout particulier à Chantal, souriante et incapable de travailler sans musique, à Marthe, toujours prête à discuter de questions existentielles avec moi, à Maxime, qui a longtemps souffert de mes interminables discours matinaux et à Sébastien, la personne m'ayant probablement le plus appris au cours de ma maîtrise et avec qui j'ai développé une grande complicité. Je remercie aussi profondément ma directrice de recherche, France Daigle, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et soutenue tout au long de mon cheminement. J'ai beaucoup apprécié travailler avec elle, autant pour son expertise que ses conversations moins scientifiques.

Finalement, je tiens à remercier ma famille, mes amis et surtout mon fiancé qui rendent ma vie aussi merveilleuse et grâce à qui je garde le sourire chaque jour. Ma maîtrise a été une période de ma vie extrêmement heureuse et je sais que je n'aurais jamais pu l'apprécier autant sans tous ces gens extraordinaires.

À France et Sébastien

1. INTRODUCTION

Les microorganismes sont présents partout sur la Terre. Certains vivent dans des zones très reculées de celles habitées par les humains où l'on commence à peine à étudier les formes de vies. D'autres partagent nos habitats et certains sont même associés avec l'humain et font partie de notre flore normale. Notre relation avec les bactéries devient problématique lorsqu'elles sont source de maladies. Certaines maladies causées par les bactéries sont connues depuis plusieurs siècles, comme la tuberculose et peuvent causer la mort. D'autres ne sont présentes que depuis quelques dizaines d'années. Lorsqu'une nouvelle bactérie pathogène « apparaît » et cause une nouvelle maladie, on dit alors que cette bactérie est émergente. L'émergence d'une bactérie peut être due à plusieurs facteurs, cette bactérie peut n'avoir jamais été détectée avant ou ce peut être une bactérie ancienne ayant acquis de nouveaux facteurs de virulence.

La « maladie du hamburger » est causée par la bactérie *Escherichia coli* O157:H7 qui est considérée comme étant une bactérie émergente. Le premier cas a été recensé dans les années 1980 (208). À cette époque, les techniques d'identification bactérienne étaient plus évoluées qu'au début du siècle et les chercheurs ont alors pensé que cette bactérie était peut-être présente depuis longtemps, mais n'avait pas été détectée. Plusieurs pays comme les États-Unis, le Canada et l'Angleterre ont vérifié 20 000 souches acquises entre 1973 et 1982 et seulement 9 ont été identifiées comme *E. coli* O157:H7; l'absence de la bactérie n'était donc pas due aux mauvaises techniques d'identification et celle-ci était réellement émergente (45, 91).

Escherichia coli est la bactérie la plus étudiée au monde. Cette bactérie peut se diviser en plusieurs catégories. Il existe des souches pathogènes pour l'humain et des souches non pathogènes de la flore normale, NFEC (« normal flora *E. coli* »). La souche *E. coli* K12 est non pathogène et couramment utilisée en laboratoire. Les souches pathogènes peuvent se diviser en pathotype, soit selon le type de maladie causé. Tout d'abord, il y a les souches intestinales et les souches extraintestinales (ExPEC). Ces dernières comprennent les souches septicémiques, les MENEC (« meningitidis *E. coli* »)

et les UPEC (« uropathogenic *E. coli* »). Les souches pathogènes intestinales se divisent principalement en 6 pathotypes : ETEC (« enterotoxigenic *E. coli* »), EIEC (« enteroinvasive *E. coli* »), EaggEC (« enteroaggregative *E. coli* »), DAEC (« diffuse adherent *E. coli* »), EPEC (« enteropathogenic *E. coli* ») et EHEC (« enterohemorrhagic *E. coli* »). Les souches EPEC causent des diarrhées sévères, parfois mortelles, particulièrement chez les enfants des pays en voie de développement (178). Ces souches peuvent former des liaisons particulièrement efficaces aux cellules intestinales de l'hôte nommées attachantes effaçantes (A/E) grâce à la présence du LEE (« locus of enterocyte effacement »). Les EHEC peuvent aussi former ces liaisons intimes, mais possèdent en plus des Shiga toxines. Ces souches sont associées à des cas très graves de diarrhée et de coliques hémorragiques chez l'homme causant de nombreux décès (73). Ce pathotype comprend la souche O157:H7 notamment appelée la bactérie de la « maladie du hamburger ». Les EHEC auraient évolué à partir des EPEC et possèdent donc beaucoup de facteurs de virulence en commun.

Les souches de *E. coli* sont parfois regroupées selon la présence de facteurs de virulence. Les STEC (« Shiga toxin *E. coli* ») peuvent produire les toxines, mais ne sont pas nécessairement des EHEC, ce dernier terme étant associé aux symptômes tandis que le premier est associé à la présence d'un facteur de virulence spécifique, les Shiga toxines. Les AEEC (« attaching effacing *E. coli* ») incluent toutes les souches de *E. coli* possédant le LEE.

1.1 SOURCE D'INFECTION, MALADIE, PRÉVENTION ET TRAITEMENT

E. coli O157:H7 est une bactérie émergente dont le premier cas a été recensé dans les années 1980. Depuis cette époque, plus de 75 000 cas sont recensés chaque année aux États-Unis et plus de 65 décès surviennent des suites de cette maladie (164). Les personnes sont principalement infectées suite à l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Plusieurs animaux peuvent être porteurs asymptomatiques de *E. coli* O157:H7, ce qui rend impossible l'identification des bêtes contaminées. Heureusement, la bactérie est facilement détruite à la chaleur. La bactérie vit dans l'intestin et ne se

retrouve habituellement pas dans les tissus plus profonds de l'animal. Pour cette raison, la viande est principalement contaminée lors de sa manipulation à l'usine, et ce, seulement en surface. Cependant, dans le cas de la viande hachée, la viande est entièrement hachée et mélangée, la totalité de la viande est à risque. Une cuisson adéquate est donc recommandée, principalement pour ce produit. La maladie causée par l'ingestion de cette bactérie est surnommée la « maladie du hamburger », car trop souvent cette viande a été à l'origine du développement de maladies chez la population. Il y a aussi un risque pour les légumes qui peuvent être arrosés ou lavés avec de l'eau contaminée. Plusieurs légumes ne sont pas cuits, ce qui augmente les risques d'infections. Aux États-Unis, à l'automne 2006, 183 personnes dans 26 états différents ont été infectées avec la souche *E. coli* O157:H7 à cause d'épinards contaminés. De ce groupe, 95 ont été hospitalisés, 29 ont développé un syndrome hémolytique urémique (SHU) et 5 personnes en sont mortes (152). Avec la mondialisation, les produits peuvent être distribués à grande échelle et il importe donc plus que jamais de bien surveiller la salubrité des aliments et de tout faire pour éviter les contaminations bactériennes.

En trois ou quatre jours, la moitié des personnes infectées avec la bactérie vont développer des symptômes assez importants pour être hospitalisées. Après l'ingestion d'aliments contaminés, les patients développent une diarrhée aqueuse modérée et pour environ 90% d'entre eux, une colite hémorragique. À plus longue échéance, 10% développent des micro angiopathies thrombotiques qui se traduisent par le SHU ou encore le PTT (purpura thrombotique thrombocytopénique). Les enfants en bas âge et les vieillards sont plus susceptibles de développer des complications comme le SHU, caractérisé par une insuffisance rénale aiguë et un taux de mortalité de 5 % ou le PTT, caractérisé par de la fièvre, des désordres neurologiques graves et un taux de mortalité de 10%. Les infections causées par les EHEC sont la plus grande cause de dysfonctionnement des reins et entraînent l'utilisation de dialyse dans 75% des cas (55). De plus, il y a des possibilités de séquelles graves au système nerveux central (55). Aucun traitement n'est encore efficace. Certaines études soutiennent que la prise d'antibiotiques peut prévenir le développement du SHU tandis que d'autres disent que les antibiotiques peuvent augmenter la production de toxines et aggraver la maladie. Une

méta-analyse a récemment été conduite, mais l'auteur conclut qu'il est encore impossible de déterminer si la morbidité ou la mortalité est diminuée en présence d'antibiotiques plutôt que d'avoir l'effet inverse (191).

Des méthodes de traitements alternatifs aux antibiotiques sont présentement investiguées. La possibilité de développement de vaccin protégeant les bovins de la colonisation par *E. coli* O157:H7 est sérieusement envisagée. Les principaux problèmes sont que les bovins ne sont pas le seul réservoir pour cette souche et que la dose minimale requise pour causer une infection est incroyablement basse (236). Même si le vaccin réussit à réduire de beaucoup la quantité de bactéries excrétées par les bovins, il reste à savoir si cette diminution va réellement entraîner une diminution du taux d'infection humaine. D'autres études portent plutôt leur attention sur l'utilisation de bactériophages spécifiques au *E. coli* O157:H7 afin de prévenir les infections de bovins (186). Cependant, il est possible que les bactéries deviennent résistantes à ces phages très rapidement surtout si l'administration de phages est faite en prophylaxie.

Pour l'instant, le meilleur traitement reste la prévention. Depuis quelques années, la santé publique insiste sur l'importance de bien cuire la viande hachée et d'éviter le plus possible la contamination croisée. La tragédie très médiatisée de la ville de Walkerton au Canada a significativement contribué à l'éducation de la population et à la prise de conscience des risques reliés à cette bactérie. Bien que l'infection se soit produite via l'eau contaminée, la population a tout de même réalisé l'ampleur des dommages que pouvait causer la bactérie de la « maladie du hamburger ».

1.2 L'ÉVOLUTION DE *E. COLI* O157:H7

Les premières épidémies de diarrhée sanglante dues à la souche O157:H7 ont été répertoriées en Oregon et au Michigan en 1982. Les symptômes des 47 personnes étaient des diarrhées, sanglantes ou non, et des crampes abdominales, mais les patients ne faisaient que peu ou pas de fièvre. Certaines personnes ont même développé un SHU (208). Des spécimens d'*Escherichia coli* O157:H7, considérés comme étant

rare à cette époque, ont été retrouvés dans les selles de plusieurs personnes malades. Des investigations plus poussées ont finalement permis d'identifier cette bactérie comme étant probablement la cause de la maladie (271). Ces patients avaient tous mangé dans un restaurant de chaîne à restauration rapide et leur repas avait en commun la viande, les cornichons et les oignons. La souche de *E. coli* O157:H7 a été retrouvée dans les pâtés de viande et les chercheurs ont donc conclu que la cuisson avait été insuffisante pour détruire la bactérie. Un isolement de cette bactérie pathogène avait préalablement été rapportée en 1975 suite à des colites sanglantes, cependant, ce n'est qu'avec ces deux épisodes épidémiques que les recherches sur cette bactérie émergente ont véritablement commencé.

La première hypothèse émise supposait que ce nouveau sérotype devait s'apparenter aux autres souches causant des colites hémorragiques ou le SHU en Amérique du Nord. La technique de «multi-locus enzyme electrophoresis» (MLEE) a été effectuée sur 17 enzymes polymorphiques et a prouvé que le sérotype O157:H7 n'était que lointainement relié aux autres souches vérotoxines positives testées (VTEC) (272). L'hypothèse suivante stipulait que ce nouveau sérotype devait probablement avoir dérivé du sérotype O157. Les chercheurs ont prouvé, grâce aux types électrophorétiques de 19 enzymes polymorphiques dont les gènes sont présents dans le génome des *Escherichia coli* O157, que tel n'était pas le cas. En effet, le groupe des O157:H7 constitue un groupe génétiquement distinct qui n'est que lointainement relié aux autres O157 (273). Les chercheurs ont donc conclu que l'ancêtre de cette bactérie pathogène émergente se retrouverait probablement parmi un autre sérotype O. Ils se sont arrêtés aux souches ayant des caractères communs à ceux de la souche O157:H7 comme la production de Shiga toxines, l'attachement intime aux cellules intestinales et la présence de l'antigène flagellaire H7. La technique MLEE a été utilisée et les types électrophorétiques de 33 enzymes ont été étudiés. Les chercheurs ont finalement conclu que les sérotypes O157:H7 et O55:H7 avaient un ancêtre commun (274). Le sérotype O55:H7 est une EPEC et son LEE est inséré dans le même locus, soit à la fin du gène *selC* que dans la souche O157:H7. De plus, leur intimine γ ne diffère que de deux nucléotides (163). Malgré les différences importantes entre ces deux bactéries

pathogènes au niveau de la virulence, la séquence nucléotidique de leur intimine est pratiquement identique ce qui indiquerait que la souche O157:H7 a évolué rapidement depuis la séparation d'avec leur ancêtre commun.

Suite à l'acquisition du LEE, la souche O55:H7 aurait acquis horizontalement le phage codant pour la toxine Stx2, résultant en une souche O55:H7 Stx2. On suppose l'acquisition des gènes de la toxine Stx2 préalable à ceux de la toxine Stx1. La séquence de la toxine Stx2 diverge beaucoup dans les différentes souches où elle est présente, tandis que Stx1 est pratiquement identique. La toxine Stx1 de *E. coli* O157:H7 est identique à celle de *Shigella dysenteriae* à un acide aminé près. L'évolution entre ces deux toxines n'aurait pas pu avoir lieu dans la récente lignée O157:H7, car la divergence entre les deux toxines est trop importante. La différenciation des toxines a donc dû s'effectuer préalablement à leur acquisition par la souche O157:H7. La particularité de l'usage des codons dans ces gènes et la distribution des gènes *stx2* chez diverses souches entériques supporte cette hypothèse.

La souche O55:H7 Stx2 aurait ensuite acquis la capacité de produire l'antigène O157, codé par un total de 13 gènes (Fig 1). Ces gènes ont un pourcentage en G+C bas suggérant ainsi une origine autre que *E. coli* (228). La nouvelle souche O157:H7 Stx2 aurait ensuite acquis le plasmide de virulence pO157. Bien qu'il soit non transférable à cause de l'insertion du gène *toxB* dans les gènes impliqués lors du transfert, il est très possible qu'il ait été acquis initialement par un transfert direct (29). Plusieurs gènes de virulence sur le plasmide semblent avoir une origine différente de *E. coli* à cause de leur pourcentage de G+C plus bas. Ce type de structure en mosaïque est souvent présent chez les plasmides des bactéries Gram négatif indiquant un transfert et des éléments de recombinaison entre certaines souches ou mêmes certaines espèces (139). À partir de ce point, deux lignées se sont développées (Fig 1). Une des lignées a perdu sa mobilité et se retrouve maintenant principalement en Allemagne et en Europe de l'est soit la souche O157:H⁻.

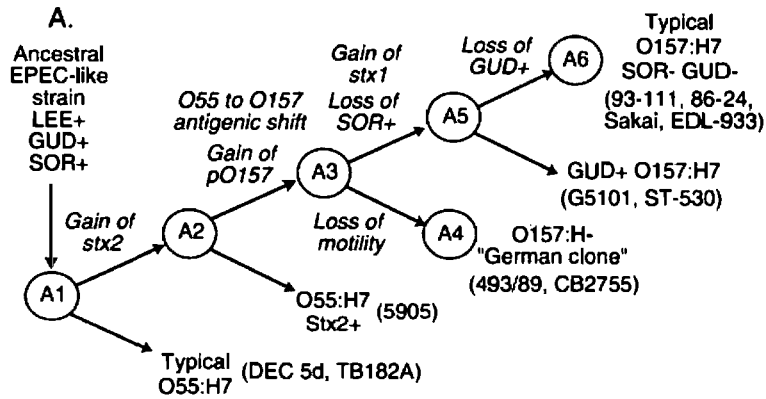


Figure 1 : Schéma de l'évolution des EHEC (Wick, 2005)

La souche O157:H7 a continué d'acquérir de nouveaux facteurs de virulence. Tout comme les gènes codant pour la toxine Stx2, ceux de Stx1 auraient aussi été acquis par transfert horizontal grâce à un phage. Il est possible que le gène *stx1* de *Shigella dysenteriae* se soit retrouvé chez *E. coli* grâce à un intermédiaire autre qu'un *E. coli* O157. Les gènes *espP* et *katP* sont absents de la lignée O157:H7 et se sont incorporés dans le plasmide pO157 chez la souche O157:H7. Ces gènes auraient vraisemblablement été inclus après la divergence de ces deux dernières souches, car l'extrémité du gène *espP* code pour des séquences d'insertion permettant ainsi aux gènes de se mobiliser et se transférer dans d'autres souches ou ailleurs dans le génome. Une délétion partielle des IS (séquences d'insertion) permet une stabilisation dans le plasmide. De plus, le gène *espP* est retrouvé sur des plasmides dans plusieurs sites différents chez d'autres *E. coli* non-O157 (25).

Depuis, certaines souches peuvent perdre des caractères, comme les souches dans lesquelles on ne retrouve plus les gènes de Stx2. Les phages peuvent s'exciser dans des cultures spontanément, ou encore lors d'une infection artificielle (6, 123). Depuis l'écllosion de cette nouvelle bactérie pathogène, elle n'a pas seulement acquis de nouveaux gènes, elle en a aussi perdu! En effet, bien qu'il y ait 1.34 Mb d'ADN spécifique à la souche O157:H7 et absent chez la souche de laboratoire avirulente K-12, il ne faut pas oublier que cette dernière possède tout de même 0.53 Mb absent chez

O157:H7 (195). Par contre, certaines pertes peuvent parfois être bénéfiques pour une bactérie pathogène. Chez *Shigella*, il y a une large région codant entre autres pour la lysine décarboxylase. Le produit final de ce gène est la cadavérine qui inhibe l'action d'une entérotoxine produite par *Shigella*. La perte de ce gène permet donc à la souche d'accroître sa virulence (161). Le gène *hemB* (porphobilinogen synthase) est un locus présent chez K-12, mais absent chez O157:H7. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse que cette délétion pouvait favoriser l'utilisation de l'hémoglobine comme une source de fer, ce que beaucoup de STEC peuvent faire, mais peu de non-STECS (139, 197, 239).

En plus de ces atouts, Cebula et son groupe de recherche ont trouvé qu'il y avait plus de 1% des souches *E. coli* O157:H7 qui avaient un taux de mutations spontanées 1000 fois plus élevée que dans des souches de *E. coli* typiques (140). De plus, la souche O55:H7, qui aurait un ancêtre commun avec *E. coli* O157:H7, aurait elle aussi un phénotype d'hypermutation. Cette souche est prédisposée à contenir des plasmides et des facteurs de virulence chromosomiques résultant de transfert horizontal. Il serait donc possible que le mécanisme à l'origine du phénotype d'hypermutation puisse aussi favoriser la rétention d'ADN étranger par la cellule. Ces phénotypes pourraient donc avoir beaucoup contribué et favorisé l'émergence de *E. coli* O157:H7 et sa rapide évolution.

Il est certain que cette souche ne cesse d'évoluer et d'acquérir de nouveaux gènes de virulence. Il est donc très important de bien surveiller son évolution et de comprendre le mieux possible son mode d'action dans le corps humain. Plusieurs facteurs de virulence sont mieux connus et les plus importants seront discutés en profondeur. Mais bien que les recherches ne cessent de fournir de nouvelles notions ou théories, les mystères de cette jeune souche émergente sont loin d'être élucidés.

1.3 LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE

Les souches K-12 et *E. coli* O157:H7 partagent un squelette d'ADN qui est somme toute linéaire. Cependant, il y a 1 387 gènes de plus chez la souche pathogène,

soit 1,34 Mb d'ADN (195). Certaines sections d'ADN semblent être transférées en bloc. Elles possèdent un pourcentage de G+C différent de celui du génome dans son ensemble et ont souvent des extrémités similaires à celles d'éléments mobiles indiquant une forte probabilité de transfert horizontal (96). Ces ensembles sont nommés îlot de pathogénicité et dans le cas de *E. coli* O157:H7, OI pour « îlot O ». La souche séquencée EDL933 possède 177 îlots O. Il est donc probable que la différence de virulence entre les deux souches soit due à ces divergences génomiques ou encore à des modifications dans des gènes présents chez les deux organismes. En plus, la souche pathogène possède un large plasmide de virulence pouvant contribuer lors de l'infection (29). Pour ce qui est de la deuxième souche séquencée (103), Sakai possède aussi 296 insertions d'ADN nommés Spl (« strain specific loops ») dont 29 de plus de 10 kb. La souche possède aussi un large plasmide de virulence nommée pO157 (153). Les deux souches pathogènes ne sont donc pas identiques.

1.3.1 La résistance à l'acidité

Pour les microorganismes dont la voie d'infection est le tractus gastro-intestinal, l'adaptation rapide aux milieux acides est extrêmement importante. Dans le cas de *E. coli* O157:H7, la bactérie peut passer d'un hamburger (pH 7) à celui de l'estomac (pH 2) en très peu de temps. L'estomac est un des milieux les moins hospitaliers du corps humain et est habituellement utilisé comme une barrière contre les microorganismes. Plusieurs mécanismes différents sont utilisés par les bactéries pour résister à ce milieu peu hospitalier. Par exemple, la tactique employée par *Salmonella* Typhimurium est celle de l'assaut ; des milliards de bactéries vont essayer de traverser l'estomac, mais un très faible pourcentage vont réussir à survivre. Cet organisme ne résiste pas à un traitement prolongé à un pH de 2,5 (84). Par contre, la souche O157:H7 est beaucoup plus résistante. Lorsque le pH extérieur est de 2,5, le pH intérieur de la bactérie passe à 4, ce qui est viable pour cette souche (67). Cette bactérie possède trois systèmes principaux de résistance à l'acidité.

Le système AR1 ("acid resistance system") est méconnu. Très peu d'informations sont disponibles sur ce système de résistance, exceptée l'implication de

la force proton motrice et sa répression par le glucose. Cette capacité d'inhibition a été très utile en recherche, car elle a facilité l'étude des autres systèmes (67).

Les deux autres systèmes de résistance à l'acidité (AR2 et AR3) sont des systèmes de résistance à l'acide dépendant d'un antiporteur et d'une décarboxylase. Le premier système fonctionne avec le glutamate (*gadA*, *gadB*, *gadC*) tandis que le second fonctionne avec l'arginine (*adiA*, *adiC*). Grâce à une décarboxylase, un groupement carboxyle de l'acide aminé est remplacé par un proton (H^+) du cytoplasme. Cette molécule modifiée est prise en charge par un antiporteur qui l'expulse de la cellule en incorporant un nouvel acide aminé. La cellule peut donc réduire sa quantité de H^+ intracellulaire et garder le pH cytoplasmique à un niveau viable (67).

Les deux décarboxylases ne sont pas à leur maximum d'efficacité au même pH. AR2 serait plus efficace à un pH de 4 tandis que AR3 serait plus efficace à un pH de 5. Selon ces données, les systèmes seraient utilisés à tour de rôle. Plus le cytoplasme s'acidifierait et plus l'utilisation de AR3 basculerait vers l'utilisation d'AR2 (32). AR2 est le plus efficace à un pH très bas et permet probablement la survie de l'organisme dans l'estomac.

1.3.2 L'adhésion

Après avoir survécu à l'estomac, les bactéries se retrouvent dans un nouvel environnement. Elles peuvent traverser tour à tour le petit intestin (duodénum, jéjunum, iléum) puis le gros intestin (colon). Il y a plusieurs milliards de microorganismes déjà présents avec qui les nouvelles venues vont entrer en compétition. Pour ne pas être expulsées hors du corps humain par les flux physiques, les bactéries doivent adhérer aux parois intestinales. C'est une étape clé de la mise en place d'une infection réussie.

1.3.2.1 Les fimbriae

Les fimbriae sont des structures extracellulaires permettant l'adhésion aux différents substrats rencontrés dans leur environnement. Dans le cas des souches pathogènes, ces structures ont un rôle important à jouer au niveau de la spécificité

d'hôte. En effet, les fimbriae vont être utiles lors des premières étapes de l'infection, permettant ou non une colonisation et possiblement une prolifération des souches pathogènes. L'adhésine d'un fimbriae est spécifique à un récepteur et celui-ci doit donc se retrouver sur la cellule pour qu'il y ait attachement. Une souche entérique qui ne peut s'attacher aux parois de l'intestin sera tout simplement évacuée par l'organisme. Il faut donc que le récepteur du fimbriae soit présent dans l'environnement où se trouve la bactérie afin de permettre une adhésion. Ce phénomène peut être organe, tissu, cellule ou encore hôte-dépendant.

Chez la bactérie *E. coli* O157:H7, il existe au moins 16 opérons fimbriaires probables (195). Certains fimbriae sont bien connus comme le fimbriae de type 1, ou encore les curli. D'autres sont en cours de caractérisation comme les Lpf, le F9 ou le Ecf. Pour la majorité cependant, il existe peu de renseignements les concernant. Des 16 fimbriae possiblement présents, 4 sont présents uniquement chez *E. coli* O157:H7, soit Lpf1, Lpf2, Z0020-Z0024 et Z1534-Z1539, tous retrouvés sur des îlots O (225).

1.3.2.1.1 Type 1

Le fimbriae de type 1 est retrouvé chez la majorité des souches de *E. coli* (188). L'opéron fimbriaire se compose de 9 gènes dont *fimH* qui code pour l'adhésine qui se lie au mannose. Ce fimbriae est très important dans la pathogenèse des infections de la voie urinaire (136). Lors d'une infection humaine aux EPEC, une réponse anticorps est montée contre les fimbriae de type 1 indiquant qu'il est exprimé *in vivo* (143). L'expression de ce fimbriae est variable et dépend de l'orientation d'un élément inversible de 314 pb. Cet élément contient un promoteur qui peut permettre la transcription « on » de l'opéron ou l'empêcher « off ». Chez la EHEC O157:H7, il y a une délétion de 16 pb qui bloque l'orientation de l'élément inversible en position OFF. Il y a donc absence d'expression de ce fimbriae peu importe les conditions. Cette mutation est spécifique aux O157:H7 et à quelques O157:H⁻ ajoutant une autre différence entre les EHEC et les EPEC (144). En plus de la délétion, il y a aussi une mutation dans l'adhésine *fimH* empêchant une possible liaison au mannose.

1.3.2.1.2 Curli

L'adhérence aux cellules de l'hôte est très importante pour la virulence d'une bactérie pathogène, mais sa persistance à long terme dépend aussi de sa capacité à survivre à l'extérieur de l'hôte. L'expression de curli par une souche de *E. coli* O157:H7 augmenterait son adhérence à long terme sur des surfaces telles que le caoutchouc, le polystyrène et le verre (194). Son expression est habituellement plus élevée à des températures en dessous de 30°C, ce qui confirmerait donc son rôle dans l'environnement. Par contre, chez certaines *E. coli* pathogènes, le fimbriae peut être exprimé à 37°C (21). De plus, les conditions microaérophiles retrouvées dans l'intestin augmenteraient l'expression de curli (78). Bien que la plupart des souches O157:H7 possèdent les gènes permettant l'expression des curli, peu de souches sont effectivement capables de former ces fimbriae (38). Lorsque les curli sont exprimés, ceux-ci auraient un rôle chez l'hôte en augmentant l'adhérence sur les cellules humaines (130). La participation de ce fimbriae à la pathogenèse de *E. coli* O157:H7 n'est pas encore élucidée.

1.3.2.1.3 Lpf1 et Lpf2

La nomenclature de Lpf provient des « long polar fimbriae » retrouvés chez *Salmonella* Typhimurium. Chez cette bactérie pathogène, le fimbriae a été associé à l'adhésion aux plaques de Peyer dans un modèle de souris (19). La forte homologie de séquence avec deux locus de *E. coli* O157:H7 présents sur des îlots O (*lpf*_{O141} et *lpf*_{O154}) suggère une fonction semblable pour ces deux fimbriae. Ils avaient été considérés comme étant non fonctionnels, car un codon stop est présent dans le gène codant pour le placier chez Lpf1 et codant pour une chaperonne pour Lpf2 (195). Par contre, il semblerait que la présence d'un codon stop dans l'opéron ne nuise pas à la formation de ces deux fimbriae (255). La structure fimbriaire propre au Lpf de *S. Typhimurium* a été observée et sa présence permettrait une meilleure adhésion aux cellules épithéliales (19). Chez la souche EHEC de lapin (RDEC), les fimbriae Lpf1 seraient importants pour l'infection et le développement d'une diarrhée importante (182). Les fimbriae Lpf1 et Lpf2 de la souche O157:H7 permettraient une meilleure colonisation et persistance chez les moutons et les cochons (120). Pour ce qui est du tropisme, une mutation de Lpf1 ou

Lpf2 chez une souche de EHEC conduit à une colonisation du petit intestin et des FAE (« follicle associated epithelium ») chez des IVOC (*in vitro* organ culture) (65). Ce phénotype inattendu est possiblement expliqué par la compensation de la bactérie par l'expression d'autres fimbriae. Ces gènes sont les seuls ayant été identifiés comme modifiant le tropisme en dehors du LEE (65). Ils n'apporteraient aucune aide pour l'adhérence ou encore l'établissement d'une infection pour les EPEC (247). Pour ce qui est de la régulation, la phase de croissance influence l'expression des deux locus, tandis que l'osmolarité et le pH influencent *lpf1* et le manque de fer influence l'expression de *lpf2* (257).

1.3.2.1.4 F9

Les gènes codant pour le fimbriae F9 situé sur l'OI-61 de la souche O157:H7 ont été identifiés comme ayant une certaine activité de transcription *in vivo* et comme étant importants lors de la colonisation du tractus gastro-intestinal des bovins (54, 148). Il pourrait aussi jouer un rôle au niveau de l'adhérence des cellules intestinales bovines quoique sa contribution ne semble pas très importante. Sa transcription est plus élevée à 28°C qu'à 37°C indiquant un possible rôle d'adhésion dans l'environnement. Il est tout de même possible qu'il soit utile à la bactérie chez l'hôte, car dans une souche de UPEC, sa transcription est augmentée dans l'urine (148).

1.3.2.1.5 Ecf

Le fimbriae Ecf (« *E. coli* common fimbriae ») a été identifié suite à sa production au contact de cultures cellulaires Hep-2 et HeLa. Il forme des petites fibres disposées de façon péritriches (Fig 2). Il est présent parmi de nombreuses souches de *E. coli* pathogènes ou non. Les patients atteints de SHU, mais aussi des personnes saines possèdent des IgG anti-Ecf. Ce fimbriae pourrait donc être utilisé par les NFEC (« Normal flora *E. coli* ») pour adhérer aux parois intestinales (207). Ce fimbriae a aussi été identifié dans une souche de *E. coli* associée à des méningites et nommé Mat pour « meningitis-associated and temperature-regulated pilus » (201). La perte du fimbriae diminue significativement l'adhésion aux cellules intestinales tant pour *E. coli* O157:H7 que pour des souches NFEC (207).

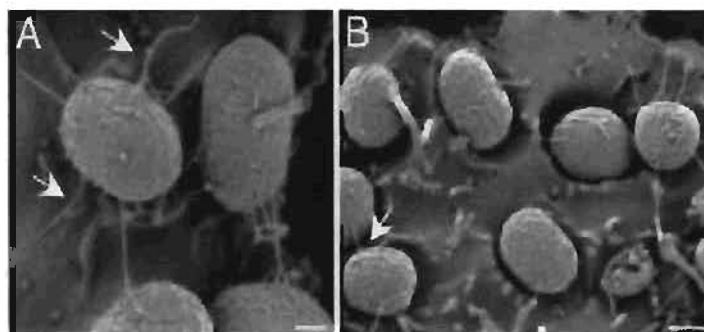


Figure 2: Adhérence de *E. coli* sur des cellules Hep-2 grâce au fimbriae Ecf (visualisation en microscopie électronique, Rendon, 2007)

Parmi les opérons fimbriaires d'*E. coli* O157:H7, l'opéron codant pour le fimbriae de type 1 possède une délétion importante et trois autres opérons possèdent un pseudogène (Lpf1, Lpf2, Z1286-Z1293), laissant supposer l'absence de structure à la surface de la cellule (195). Des tests d'expression génique n'ont toujours pas confirmé la transcription des autres systèmes (149). Deux hypothèses ont été avancées afin expliquer les rôles et conséquences biologiques potentiels d'un répertoire réduit de fimbriae fonctionnels: i) le tropisme de cette souche envers l'extrémité du gros intestin pourrait être une conséquence de l'adhérence limitée aux autres sites de l'intestin et ii) la production de fimbriae pourrait entrer en conflit avec la formation du SST3 (système de sécrétion de type trois) qui permet l'attachement intime (56, 149). *E. coli* O157:H7 n'est pas la seule bactérie pathogène entérique dans cette situation. Sur 13 fimbriae possiblement exprimés par *Salmonella* Typhimurium, très peu ont été visualisés sur la surface de la cellule ou ont démontré un tropisme envers les cellules épithéliales de l'hôte (18). Sur 14 fimbriae chez *Shigella flexneri* 2a, 11 opérons fimbriaires contiennent un changement de cadre de lecture, 1 a une mutation ponctuelle et 2 sont tronqués par des éléments IS (118). Il ne faut pas oublier que les fimbriae sont des structures très exposées qui peuvent facilement stimuler le système immunitaire de l'hôte, ce qui n'est pas souhaitable pour l'établissement d'une infection bactérienne. Ces structures sont

spécifiquement exprimées dans des conditions très précises ou pendant un laps de temps très court, ce qui complique leurs études en laboratoire.

1.3.3.2 Les adhésines

Les adhésines sont des molécules permettant un attachement aux cellules de l'hôte. Les plus connues sont les adhésines Iha, EfaI, ToxB et OmpA (la protéine A de la membrane externe).

Le gène *iha* codant pour la protéine du même nom, permet une adhérence aux cellules épithéliales lorsque celui-ci est introduit dans une souche de *E. coli* non adhérente de laboratoire. Iha est similaire à VirA de *Vibrio cholerae* qui est impliqué dans la colonisation et la virulence. Chez les ExPEC, Iha a été reconnu comme étant impliqué dans l'approvisionnement en fer en plus de son rôle dans l'adhésion et la virulence (142). Chez *E. coli* O157:H7, l'adhésine se retrouve dans la OI-43 et la OI-48 nommée TAI pour « tellurite and adhesion island » (244). Le gène est donc dupliqué dans la souche *E. coli* O157:H7 EDL933, mais non dans la souche Sakai (103, 195). Iha est une adhésine largement distribuée parmi les STEC, elle pourrait donc participer à la colonisation, mais sa seule présence ne serait pas suffisante pour conférer un phénotype aux *E. coli* O157:H7 (253). Cette adhésine est régulée par Fur et est donc exprimée en absence de fer tout comme d'autres facteurs de virulence importants (203).

EfaI (« EHEC factor for adherence») a été découvert chez une souche de EHEC O111:H^r et sa mutation entraîne une baisse d'adhérence aux cellules épithéliales (183) et une baisse de la colonisation de l'intestin bovin chez les STEC (237). Cette adhésine est présente chez les EPEC où elle participe aussi à l'adhésion des cellules épithéliales (11). Ce gène est présent sur l'OI-122 et possède une homologie avec ToxB, présent sur pO157. Par contre, EfaI et ToxB agiraient sur la transcription du LEE en promouvant la sécrétion des protéines par le SST3 (235). Une souche sans le plasmide pO157 voit son nombre de micro-colonies et sa sécrétion de EspA, EspB et Tir diminué, ce phénotype étant restauré avec ToxB (245). Il n'est donc pas tout à fait certain si Efa et ToxB ont un rôle d'adhésine ou seulement de régulateur du LEE.

OmpA est une adhésine de *E. coli* O157:H7, car son mutant a une adhérence réduite aux cellules épithéliales HeLa et Caco2 (256). OmpA possède beaucoup de fonctions probables et semble impliquée à plusieurs niveaux dans le métabolisme de la cellule. De plus amples recherches vont être nécessaires pour bien définir son rôle dans l'adhérence.

1.3.2.3 L'attachement intime

1.3.2.3.1 Description du LEE

Les infections causées par les EPEC et les EHEC ont une histopathologie semblable au niveau de l'adhérence des bactéries aux cellules intestinales. Il est possible d'observer des liaisons attachantes effaçantes (A/E) qui résultent de la liaison intime de la bactérie aux entérocytes, de l'effacement des microvillis au site d'adhésion et du réarrangement du squelette d'actine. Dans la cellule, une structure d'actine semblable à un piédestal est formée sous la bactérie. Ces événements sont reproductibles chez les épithéliums d'animaux tel que le lapin et ont été associés aux EPEC (171). Le gène *eae* a été identifié comme étant essentiel à la formation de A/E dès le début des années 90 (117). Ce gène se retrouve dans pratiquement toutes les souches de EPEC, EHEC et RDEC qui causent des lésions A/E (117). Ce gène codé dans une large région d'ADN d'environ 35 kb est essentiel à la formation des lésions A/E. Cet îlot de pathogénicité a été nommé le LEE pour « locus of enterocyte effacement » (162).

La présence de l'îlot de pathogénicité LEE est une caractéristique partagée par les EPEC et les EHEC, ainsi que par les RDEC et *C. rodentium*. Il a été étudié plus intensément chez les EPEC et les conclusions des expériences sont souvent transposées aux EHEC. Lors de différences notoires, celles-ci seront spécifiées, en particulier en ce qui a trait à l'intimine. Le LEE est divisé en 5 opérons polycistroniques (LEE1-LEE5) codant pour un système de sécrétion de type III (SST3), des effecteurs, des régulateurs et l'intimine. Le SST3 est une structure permettant l'injection de protéines bactériennes directement à l'intérieur des cellules hôtes. Ce système s'apparente fortement aux flagelles et a une structure en forme d'aiguille (5). Les SST3 de plusieurs différents organismes comme *Shigella*, *Salmonella* et les EPEC ont été visualisés en microscopie

électronique et sont semblables de structures (Fig 3) (134, 156, 243). Tout d'abord, il y a formation du corps de la structure qui s'insère dans la membrane interne (EscR-S-T-U-V), traverse le périplasme (EscJ) et s'insère dans la membrane externe (EscC) (Fig 3). La protéine EscF constitue l'aiguille et EspA, le filament reliant la bactérie à une cellule hôte. Afin de former un pore dans la cellule hôte, les protéines EspB-D vont s'insérer dans la membrane de l'hôte (75). La particularité du SST3 des *E. coli* est la présence du filament EspA qui n'est pas présent chez *Shigella* ou *Salmonella* (Fig 3). Il forme un canal de 25Å permettant la translocation de protéines (44).



Figure 3 : Visualisation d'un SST3 purifié et d'un schéma de SST3 indiquant les différentes sous-unités nécessaires à sa construction (Marlovits, 2004; Garmendia, 2005)

1.3.2.3.2 Régulation de l'expression du LEE

Ce système code pour une structure extracellulaire imposante pouvant activer le système immunitaire et son expression doit donc être régulée très étroitement. La régulation de l'expression du LEE chez les EPEC est différente de celle chez les EHEC. Chez les EPEC, elle se base principalement sur le gène *ler* (« LEE encoded regulator ») et *per* (« plasmid encoded regulator ») présent sur le plasmide de virulence qui régule aussi l'expression des « bundle forming pili » (BFP), fimbriae importants dans la virulence des EPEC. Il y aurait des homologues de *per* chez les EHEC nommés *pch* qui

contribueraient à la régulation de l'expression du LEE (82, 113). Les EHEC ne possèdent ni BFP ni *per*, mais possèdent *ler* en commun avec les EPEC. La régulation de l'expression du LEE est complexe et seulement un survol des différents gènes ayant été identifiés comme ayant un effet de régulation sur le LEE sera fait.

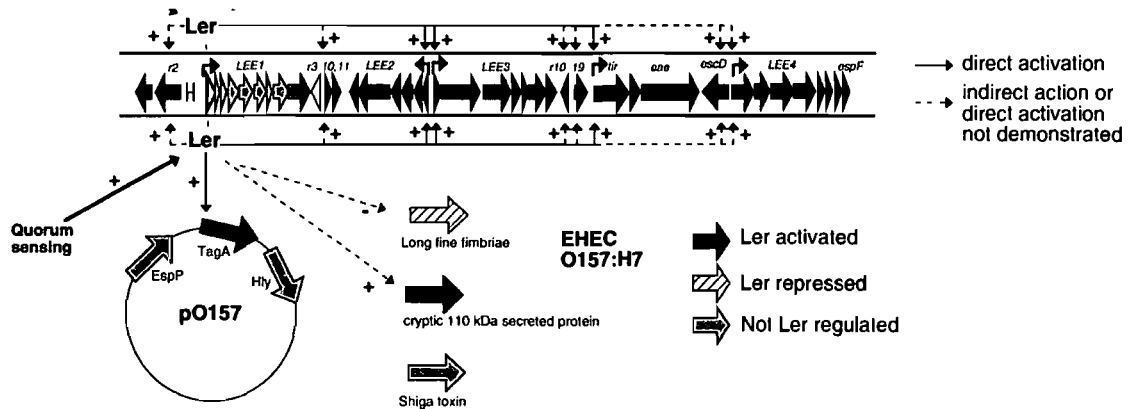


Figure 4: Organisation du LEE et régulation de celui-ci par des gènes du LEE et d'autres gènes (adapté de Elliott, 2000)

Ler est encodé dans l'opéron *LEE1* et active l'expression du LEE dans son ensemble, avec néanmoins un effet plus faible pour l'opéron *LEE4* (Fig 4). Ce régulateur pourrait aussi activer l'expression d'autres gènes ailleurs dans le génome et même sur le plasmide *pO157* (*tagA*) (Fig 4). Il régulerait aussi négativement l'expression d'autres facteurs de virulence importants pour l'adhésion aux cellules intestinales (57). La transcription de *ler* est influencée entre autres par le « quorum-sensing » (234). Le quorum-sensing est un mécanisme de communication entre les bactéries via la production de certains composés spécifiques. La bactérie pourrait donc « sentir » la présence d'autres bactéries de son genre ou non (180, 234). Le quorum-sensing activerait directement *LEE1* (*ler*), *LEE3* et, indirectement, *LEE2* et *LEE5* (234). À l'intérieur même du LEE, il y aurait deux autres régulateurs fonctionnant de pairs, *GrlA* (« global regulator of LEE activator ») et *GrlR* (global regulator of LEE repressor). Ces régulateurs stimulent l'expression de *ler* et ils inhiberaient la formation des flagelles

(111). Ces deux organelles, SST3 et flagelle, ayant probablement évolué d'une même structure, il n'est pas étonnant qu'ils partagent un régulateur en commun. Cette double régulation serait excessivement importante pour établir une adhésion intime aux cellules, car la mobilité de la bactérie pourrait entraver sa liaison avec les cellules de l'hôte (111). D'autres régulateurs sont aussi présents sur un autre îlot de pathogénicité (OI-115) qui encode un deuxième SST3, ETT2 (« *E. coli* type III secretion system 2»). Bien que celui-ci ait été désigné comme non-fonctionnel, il encode tout de même des régulateurs pouvant influencer l'expression des gènes du LEE (278). Le premier régulateur est *eivF* (ECs3734), un homologue de *invF*, un régulateur d'un SST3 chez *Salmonella* Typhimurium. Le deuxième régulateur est *etrA* (« ETT2 regulator A ») (Z4184). Cette régulation croisée pourrait s'expliquer par l'évitement de la bactérie à exprimer deux structures multiprotéiques complexes pouvant entrer en conflit ou encore, éviter une demande en énergie trop importante (278). D'autres mécanismes de régulation de l'expression du LEE ont été découverts, comme le régulateur RpoS, la protéase ClpX, la protéine Hha, les protéines PchABC et des facteurs environnementaux (osmolarité, température, calcium, magnésium) (20, 112, 113, 222, 254). Il n'est pas étonnant qu'autant de systèmes de régulation soient à l'œuvre concernant l'expression du LEE, car son importance dans l'établissement de l'infection est centrale.

1.3.2.3.3 Établissement de l'attachement intime

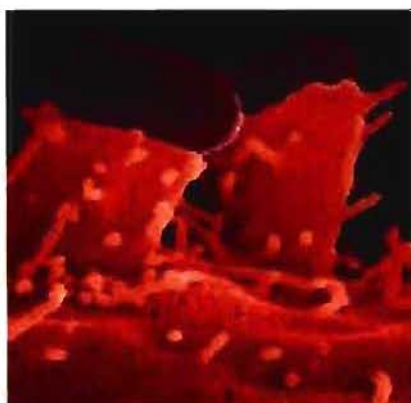


Figure 5 : Attachement intime d'une EPEC sur des cellules intestinales (site internet de Bret Finlay)

Dans le cas des EPEC, la bactérie adhérerait aux parois intestinales grâce aux Bfp (« Bundle forming pili ») et ensuite intimement aux cellules grâce au SST3 (37, 252) (Fig 5). Pour ce qui est des EHEC, aucun mécanisme d'adhésion pré-attachement intime n'a encore été découvert. Il est toutefois possible que le filament EspA puisse stabiliser l'attachement bactérie-cellule en attendant la liaison entre l'intimine et Tir (37).

Une fois le filament EspA lié à la membrane de l'hôte, les protéines EspB et EspD s'y insèrent pour y former un pore et les effecteurs sont injectés. L'effecteur le plus connu est Tir («translocated intimine receptor»). Cette protéine d'origine bactérienne est introduite dans les cellules intestinales par le SST3 (128). Ses résidus sérine vont être phosphorylés par la cellule hôte et Tir va former des dimères qui s'inséreront dans la membrane cytoplasmique (270). La partie extracellulaire va pouvoir adhérer à l'intimine exprimée à la surface de la bactérie. Une deuxième phosphorylation tyrosine dépendante survient chez les EPEC et conduit à une polymérisation de l'actine permettant la formation du piédestal (Fig 6). Cependant, ce résidu n'est pas présent chez les EHEC (51). Un autre effecteur, TccP («tir-cytoskeleton coupled protein») est nécessaire pour activer la cascade d'enzymes nécessaires au réarrangement du cytosquelette (74).

L'intimine possède deux régions principales. Son extrémité N-terminale est hautement conservée, tandis que les 280 derniers acides aminés de son extrémité C-terminale (Int280) sont variables. Cette région permet une classification des intimines en plusieurs types, 17 jusqu'à présent (76). Les types les plus répandus sont α , β , γ et δ , avec une nette prévalence des trois premiers. Le premier type (α) serait associé à la branche évolutive EPEC-1 et le deuxième (β) serait largement répandu tant dans les souches AEEC (« attaching-effacing *E. coli* ») animales qu'humaines. Le troisième type (γ) est plutôt restreint aux EHEC, ainsi qu'à une EPEC atypique O55:H7 qui serait l'ancêtre de *E. coli* O157:H7 (voir section 1.2) (4).

Suite à plusieurs expérimentations, la communauté scientifique est en mesure d'affirmer que les différentes intimines auraient un rôle à jouer au niveau de la spécificité d'hôte ainsi que du tropisme intestinal (261). Les EPEC colonisent principalement le petit intestin et les EHEC, le FAE («follicle associated epithelium») qui est l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer dans l'ileum. Cette différence de tropisme est partiellement imputable à l'intimine. L'intimine α permettrait une liaison au petit intestin majoritairement et l'intimine γ principalement au FAE (66). Plusieurs autres candidats concernant le tropisme intestinal ont été écartés comme les Bfp et le

filament EspA. En plus d'être importante pour le tropisme intestinal, l'intimine participerait aussi à la spécificité d'hôte. En effet, la faible prévalence des EHEC chez les porcelets pourrait être expliquée par la faible liaison de leur intimine sur la paroi intestinale (79). Ce phénomène est indépendant de la présence de Tir donc la liaison de l'intimine avec une protéine de l'hôte semble évidente.

La nucléoline a été identifiée comme étant un récepteur pour tous les différents types d'intimines, mais sa liaison entrerait en compétition avec Tir. Cette protéine ne peut donc pas être un facteur de tropisme intestinal (229, 230). Un autre récepteur probable liant l'intimine a été découvert : l'intégrine. Ces deux molécules peuvent lier l'intimine, mais leur implication lors de l'attachement intime n'a pas été prouvée. Aucun lien ne peut non plus être fait quant au tropisme intestinal différent entre les EHEC et EPEC. D'autres candidats sont présentement recherchés.

1.3.2.3.4 Autres effecteurs et fonctions

Plusieurs autres effecteurs, présents ou non sur le LEE, peuvent être sécrétés par le SST3. Map (« mitochondria associated protein») et EspF perturbent le potentiel de membrane des mitochondries, permettent l'apparition de pseudopodes au début de l'infection et dégradent les jonctions serrées de l'intestin selon un mécanisme mitochondrie-indépendant (47, 127). EspG et EspH agiraient plutôt au niveau de la polymérisation d'actine et de la destruction de filament de microtubules directement sous le piédestal (223, 260). La fonction de SepZ est encore inconnue, bien que l'on sache qu'il est introduit dans la cellule. Individuellement, tous ces effecteurs ne sont pas nécessaires à l'établissement d'infection lors d'expérimentations *in vivo*. Des études ont permis d'identifier plusieurs effecteurs qui n'étaient pas présents dans le LEE. Les nouveaux effecteurs (6) sont nommés Nle pour « non-LEE effector ». Plusieurs sont présents dans d'autres îlots de pathogénicité (OI-36, OI-122, OI-71) (49). L'activation par Ler, la transcription et la sécrétion de NleA a été démontrée, mais sous les conditions testées, aucune autre protéine Nle n'a pu être détectée (211). Plusieurs autres effecteurs potentiels ont été découverts grâce à une combinaison de bioinformatique, de protéomique et de tests biologiques (252). Plusieurs homologues d'effecteurs de SST3

de bactéries pathogènes pour les plantes ont été découverts. Ces nouveaux effecteurs se retrouveraient principalement parmi les gènes encodés sur les phages et les auteurs avancent l'hypothèse d'un vaste métagénome phagique connecté au SST3.

Les systèmes de sécrétion de type III sont des facteurs de virulence de première importance. Les effets de ceux-ci dépendent des effecteurs qui vont agir sur les composantes des cellules de l'hôte. Ces effecteurs sont très importants et leur nombre peut augmenter si la bactérie acquiert de nouveaux gènes. Les EHEC possèdent un deuxième SST3 compris dans l'OI-115 (278). ETT2 contient beaucoup de mutations, de délétions et d'inversions, ce qui rend l'expression et la formation d'une deuxième organelle impossible. Par contre, il est possible que des effecteurs de ce système de sécrétion soient transloqués grâce à la présence du LEE. Il reste encore beaucoup à découvrir sur les différents effecteurs et leurs apports dans la virulence des EHEC.

1.3.3 Les Shiga toxines

Les EHEC se distinguent des EPEC principalement à cause de la présence de Shiga toxines. Il existe deux types de toxines, Stx1 et Stx2. Il existe un opéron codant pour la toxine Stx1, *stx1AB* et plusieurs opérons variants possibles de *stx2AB*. Les souches peuvent contenir jusqu'à deux différentes toxines Stx2. Les toxines seraient responsables des dommages causés aux cellules endothéliales de la lamina propria de l'intestin pouvant résulter en des diarrhées sanglantes, mais aussi de ceux faits dans le glomérule rénal pouvant résulter en l'apparition du SHU et dans le cerveau pouvant résulter en l'apparition de PTT. Les Shiga toxines sont un facteur de pathogénicité majeur parmi les plus étudiées associé aux EHEC.

1.3.3.1 Apport dans la maladie

Lors d'une infection aux EPEC, le principal symptôme intestinal est une diarrhée simple, tandis que chez les EHEC, cette diarrhée est sanglante. Le principal facteur de virulence divergent étant la présence de toxines chez ce dernier, le lien entre les dommages intestinaux et les toxines a donc été étudié. L'ajout d'une toxine dans une souche n'en possédant pas aggrave grandement les symptômes dans un modèle animal

de lapin. La toxine influence donc la gravité de la maladie (231). La présence de la toxine entraînerait l'apparition de diarrhées sanglantes, mais les A/E seraient suffisantes pour causer une simple diarrhée (178). Évidemment, la présence seule des toxines ne peut entraîner toutes les autres conséquences reliées à une infection aux EHEC. Il est donc clair que bien que les toxines soient importantes, ce ne sont pas les seules responsables de l'apparition de symptômes intestinaux. De plus, les cellules intestinales humaines n'expriment pas de Gb3 qui est le récepteur des toxines. Par contre, ces cellules peuvent tout de même endocyter les toxines et les cliver, mais sans qu'il n'y ait présence de cytotoxicité (221). Les toxines empêcheraient l'induction de la chaîne métabolique du NFκB ce qui modulerait la réponse immunitaire des cellules intestinales. Elles diminueraient la transcription de chémokines CCL-20 et IL-8 diminuant ainsi la réponse inflammatoire (80). La toxine agirait au niveau de la transcription chez les cellules n'exprimant pas Gb3. Dans les cellules possédant Gb3, la toxine interfère avec la traduction de l'ARNm, induire la mort cellulaire et stimuler des gènes proinflammatoires (193).

1.3.3.2 Structure, sécrétion et mode d'action

Les deux toxines, Stx1 et Stx2, présentes chez les EHEC sont encodées par des gènes présent sur des bactériophages (238). Les souches de *E. coli* O157:H7 ont généralement les deux toxines, ou seulement Stx2. Le gène *stx1* est pratiquement identique à la au gène de la Shiga toxine de *Shigella dysenteriae*, sauf pour 1 seule paire

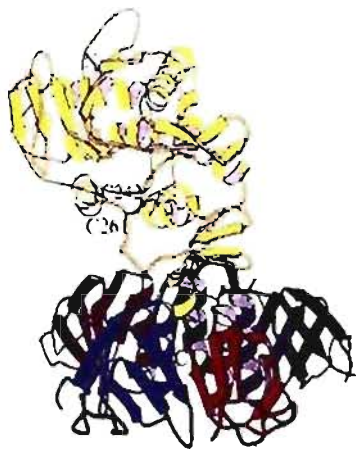


Figure 6 : Crystal de la toxine Stx1 de *Shigella* (Fraser, 1994)

de bases et est très conservée parmi les souches (185). Comparativement, Stx2 possède plusieurs variants comme Stx2, Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, Stx2f et Stx2g. Certains variants sont plus virulents et sont plus impliqués lors de développement de SHU comme Stx2 et Stx2c. D'autres sont beaucoup moins virulents et sont principalement présents chez les animaux, Stx2e (porc) et Stx2f (pigeon) (278). Entre les gènes *stx1AB* et *stx2AB*, il y a 55%

d'homologie pour la sous-unité A et 57% pour la sous-unité B (115).

La sous-unité A peut se diviser en deux parties : A₁ représente la portion possédant l'activité enzymatique et A₂, celle se liant au pentamère B. Le pentamère de sous-unité B se lie à son récepteur Gb3 (globotriacylcéramide-3) ou Gb4 dans le cas du variant Stx2e (Fig 6) (198). Les toxines peuvent être sécrétées par des vésicules de la membrane bactérienne (131). Une fois relâchées, les toxines vont se retrouver dans l'intestin où elles vont pouvoir traverser les parois intestinales, se retrouver dans la circulation sanguine et se lier aux cellules possédant le Gb3 comme les cellules endothéliales. Après la liaison, elles vont être internalisées par les cellules de l'hôte via une endocytose clathrine dépendante (214). Elles subissent un transport rétrograde à travers l'appareil de golgi pour atteindre le réticulum endoplasmique. La sous-unité A₁ est transloquée dans le cytoplasme où elle se lie à la sous-unité ribosomale 60S et exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S empêchant ainsi toute synthèse protéique (125). Ce mécanisme entraîne la mort cellulaire. Les cellules endothéliales des reins et celles du cerveau sont particulièrement touchées.

Les toxines Stx1 et Stx2 ont des effets différents. Les cellules intestinales endothéliales seraient 10 fois plus sensibles à la toxine Stx2 que Stx1, et les cellules endothéliales glomérulaires, 1000 fois plus sensible (221). La toxine Stx2 pourrait aussi promouvoir l'adhérence intestinale en augmentant la quantité de nucléoline présente à la surface des cellules intestinales. La nucléoline est un récepteur potentiel eucaryote pour l'intimine (voir section 1.3.2.3.3) (210). Une étude statistique a établi un lien entre la présence de l'intimine et de la toxine Stx2 supportant ainsi la possibilité d'une synergie entre les deux molécules. De plus, ces souches étaient statistiquement liées à des maladies plus graves (24). Il a aussi été noté que le variant Stx2 est le plus prévalent chez les patients ayant développé un SHU. De plus, les patients infectés avec une souche ayant seulement Stx2, sans Stx1, étaient significativement plus à risque de développer des complications (189). Seuls les variants Stx2 et Stx2c ont été retrouvés chez les souches de patients développant un SHU, indiquant que les autres variants ne conduisent pas à des complications systémiques (68). Ces données sont particulièrement importantes pour identifier les patients potentiellement à risque de développer une

maladie plus systémique et ainsi pouvoir suivre l'évolution de leur maladie de façon plus assidue.

1.3.3.3 Régulation

Les toxines sont codées par des bactériophages de type λ présents dans le génome des EHEC. Chez EDL933, les gènes *stx1* se retrouvent dans le phage CP-933W de l'îlot de pathogénicité 93 et les gènes *stx2* se retrouvent dans le phage BP-933W de l'îlot de pathogénicité 45. L'induction des prophages conduit à une phase lytique qui est habituellement activée par RecA, lui-même induit par une réponse SOS suite à des dommages à l'ADN (226). L'activation du stade lytique va stimuler la transcription des phages incluant les gènes de type tardif dont font partie les gènes des toxines. Habituellement, lorsque le stade lytique est très avancé, les bactéries vont lyser, relâchant ainsi les particules phagiques, mais aussi les toxines (199).

Les toxines sont codées par des opérons à deux gènes, *stx1AB* et *stx2AB* et peuvent être transcrit grâce au promoteur spécifique aux toxines, mais aussi par un promoteur contrôlant l'expression des gènes tardifs du phage. L'expression des gènes du prophage est régulée selon des terminateurs et des antiterminateurs permettant ainsi une régulation étroite. Le promoteur tardif, P_R' , est responsable de la transcription des gènes des toxines (181). Lorsque le phage passe de la phase lysogénique à celle lytique, l'expression de plusieurs gènes participant aux différentes étapes de phase lytique est induite dont les gènes tardifs qui dirigent aussi la transcription des gènes de toxines. Ce phénomène d'induction serait constamment présent dans une petite fraction de la population bactérienne. Par contre des conditions qui endommagent l'ADN et des drogues comme la mitomycine provoquent l'induction du prophage et peuvent augmenter la production de toxines, indiquant ainsi le lien direct entre la production de toxine et le niveau d'induction du prophage (2, 269).

Les gènes des toxines peuvent aussi être régulé directement grâce à leur promoteur spécifique. Néanmoins, la régulation de la transcription des opérons encodant les toxines Stx1 et Stx2 n'est pas identique. Le promoteur du gène *stx1* est identique à

celui de la Shiga toxine de *S. dysenteriae*. Le corépresseur Fur-Fer va pouvoir se lier sur un site de liaison « Fur » près du promoteur, ce qui va permettre une régulation suite à la présence de fer. La transcription de la toxine serait inhibée par un environnement riche en fer (31). Les deux sous-unités seraient codées par un ARNm bicistronique, mais il y aurait aussi présence d'un deuxième promoteur en amont du gène *stx1B* (132). Ce deuxième promoteur, quoique son activité soit controversée, ne possède pas de boîte de régulation Fur et est six fois moins efficace que le promoteur de l'opéron bicistronique. Ce deuxième promoteur aurait pu être partiellement responsable du ratio A1 :B5 nécessaire pour l'assemblage de la toxine en augmentant la quantité d'ARNm de *stx1B*, mais une étude démontre que la transcription des sous-unités A et B, donc la stochiométrie ne proviendrait pas d'une régulation transcriptionnelle (279). La structure tertiaire de l'ARNm pourrait aussi influencer la transcription de *stx1B* (95). Pour ce qui est de *stx2*, il n'y aurait pas de boîte de régulation Fur rendant sa transcription indépendante de la concentration en fer et il n'y aurait pas de site de liaison de ribosome en aval de *stx2B* (241). Le niveau d'acide nitrique (NO) pourrait influencer la transcription de *stx2* en diminuant l'induction de RecA même en présence d'une situation nécessitant la mise en place d'une réponse SOS (265). La toxine étant de type AB5, il y a un ratio de protéine à respecter pour l'assemblage. Le mécanisme permettant l'établissement de ce ratio de 1: 5 est encore inconnu, mais ne serait pas exclusivement transcriptionnel (107, 184).

Le SHU est caractérisé par une défaillance grave du système rénal. Cette défaillance est causée par la destruction de cellules épithéliales glomérulaires et par l'obstruction des capillaires par de la fibrine et des plaquettes. Le rein ne peut plus filtrer le sang et il y a dysfonction rénale (170). Les toxines se rendent jusqu'au rein en empruntant le système sanguin qui va être accessible suite aux lésions dans l'intestin causant les diarrhées sanglantes. Dans le sang, les toxines pourraient lier les leucocytes polymorphonucléaires sur un récepteur différent du Gb3 et ainsi se promener dans la circulation sanguine (251). Les toxines peuvent aussi utiliser un deuxième mécanisme d'entrée soit le passage transcellulaire. Elles traversent la barrière intestinale sans destruction de tissus apparents et vont pouvoir entrer dans la circulation sanguine (3).

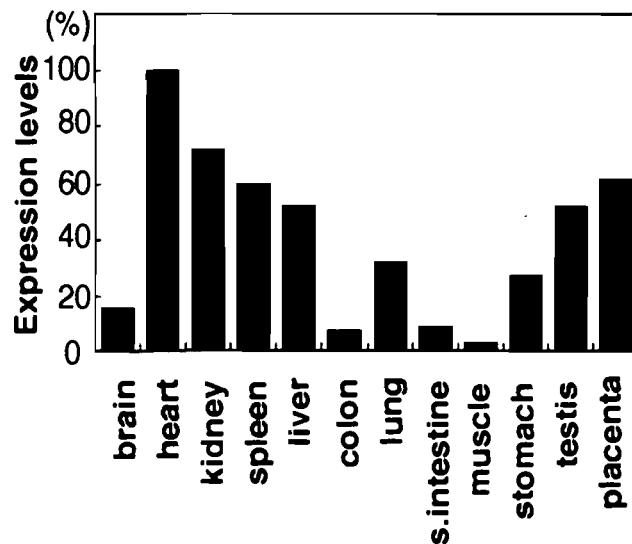


Figure 7 : Niveau d'ARNm de Gb3 dans les tissus humains (Normalisé par rapport au niveau du cœur) (Kojima, 2000)

Les toxines vont ensuite se lier au Gb3 qui est présent à différentes concentrations dans l'organisme (Fig 7). Le niveau d'expression de Gb3 à la surface est un facteur qui pourrait expliquer la distribution des symptômes liés à la présence de la toxine, mais il n'est pas le seul. D'autres facteurs inconnus influencent le tropisme de la toxine.

1.3.4 Le plasmide pO157

Pour les *E. coli* O157:H7, il y a deux souches séquencées: EDL933 provenant des États-Unis et Sakai, provenant du Japon. Les deux gros plasmides de virulence de ces souches ont été séquencés en 1998, soit trois ans avant les génomes des souches en entier (29, 153). Le plasmide pO157 provenant de EDL933 sera principalement discuté (Fig 8). Sa composition en G+C est plus faible que celui du génome de *E. coli* et certaines régions possèdent des codons inhabituels pour certains acides aminés. Il est possible d'identifier des îlots encadrés par des séquences d'éléments transposables ce qui confirme la mosaïcité du plasmide. Le plasmide n'est pas uniforme parmi tous les EHEC : il change de composition entre les différentes souches (25). Le plasmide pO157 possède 92 700 pb et 100 cadres de lecture principalement codés dans la même direction. Lorsque le plasmide a été séquencé, 19 gènes de celui-ci étaient déjà connus et

considérés comme des facteurs de virulence potentiels représentant 27% de l'ADN plasmidique. Ces gènes codent pour une catalase peroxydase, *katP*, une sérine protéase, *espP*, un système de sécrétion de type II, *etp*, ainsi qu'une toxine probable, *toxB* (26, 27, 216, 218). Ce dernier gène, *toxB*, a été découvert grâce au séquençage.

KatP est une catalase peroxydase découverte sur le plasmide et le P représente son origine. Elle aurait un domaine membranaire et son activité se situerait principalement au niveau du périplasma (27). *E. coli* possède déjà deux catalases peroxydases dans son génome. Elles serviraient à la résistance contre le stress oxydatif qui peut avoir lieu dans les neutrophiles ou les macrophages, permettant ainsi de contrer les systèmes de défense de l'hôte (59).

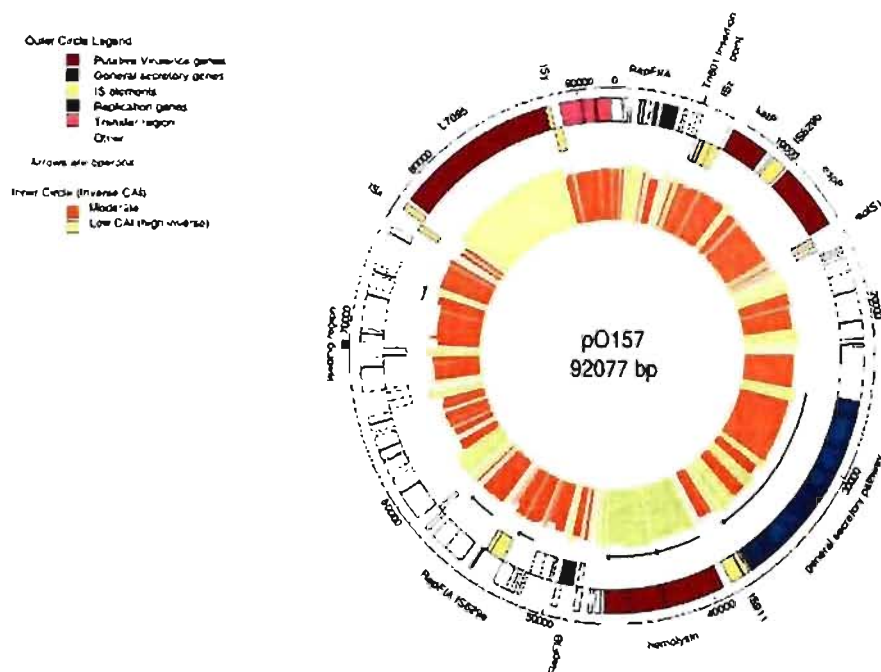


Figure 8: Plasmide de virulence pO157 (adapté de Blattner, 1998)

EspP est une sérine protéase sécrétée qui clive le facteur V de coagulation humain. Le corps fabrique des anticorps contre cette protéine ce qui prouve qu'elle est exprimée *in vivo* (26, 27). Ce facteur est important pour la coagulation et son clivage résulterait par un saignement prolongé, augmentant ainsi les symptômes de diarrhée

sanglante (123). Cependant, sa présence n'est pas obligatoire pour l'apparition de symptômes ou l'établissement d'un SHU (23).

StcE est une zinc-métalloprotéase exprimée *in vivo* initialement nommée TagA (192). Elle agit sur les glycoprotéines de la salive et celles de la mucine intestinale pour faciliter le parcours de la bactérie. L'attachement intime serait facilité si StcE clive la couche de mucine qui protège les cellules épithéliales. De plus, la protéase va agir sur une protéine du sang (lors de diarrhée sanglante), ce qui va permettre une diminution de la lyse dépendante du complément (92, 93, 137, 138). L'expression de ce gène serait positivement régulé par Ler, le régulateur du LEE (57, 138).

Le groupe de gènes *etp* est très homologue à un système de sécrétion de type II d'entérobactérie. Ce système permet l'excrétion de protéines à l'extérieur de la bactérie grâce à un système *sec* dépendant (217). Ce système de sécrétion serait nécessaire à l'exportation de StcE, présent aussi sur le plasmide (138).

Le plasmide pO157 confère une activité hémolytique de type α à la souche EDL933 grâce au locus *ehxCABD* (219). Des patients ayant le SHU font des anticorps contre Ehx (216). Cette toxine fait partie de la famille RTX, mais est assez différente de l'hémolysine Hly, toxine importante chez les UPEC. Elle lyse spécifiquement les érythrocytes humains et de moutons, les leucocytes de bovins, mais pas les leucocytes humains (16). Elle lie et lyse beaucoup moins efficacement les érythrocytes que l'hémolysine Hly (17). Un de ses rôles possibles serait de libérer l'hémoglobine qui pourrait servir de source de fer à la bactérie (133).

Le gène *toxB* est présent sur le plasmide des *E. coli* O157:H7 et chez certaines EHEC ou EPEC, mais parfois seulement partiellement (259). Il possède une homologie de protéine de 20% avec la toxine B de *Clostridium difficile* et de 28% avec le produit du gène de virulence *efa-1/lifA* présent chez les AEEC. Une copie du gène tronqué est aussi présente sur le chromosome dans l'îlot de pathogénicité O-122. L'expression de la protéine ToxB augmente l'adhérence aux cellules intestinales en promouvant la

sécrétion de protéines par le SST3 et cette régulation se ferait à un niveau post-transcriptionnel (235, 246).

Plusieurs gènes connus du plasmide jouent un rôle au niveau de la virulence des EHEC. Par contre, il est difficile de déterminer quels gènes influencent quelles étapes de l'infection. Avec plusieurs dizaines de gènes possédant des fonctions tout à fait inconnues, ce plasmide peut encore réserver bien des surprises.

1.3.5 Les îlots de pathogénicité

Lorsque le génome d'*E. coli* O157:H7 (EDL933) a été séquencé, il a immédiatement été comparé à celui de la souche de laboratoire *E. coli* K-12 (MG1655) (195). Les deux organismes auraient eu un ancêtre commun il y a environ 4,5 millions d'années, ce qui est plutôt récent (206). Ces deux organismes sont très différents dans leur pathogénèse, mais ils partagent encore une structure d'ADN commune assez linéaire. Les insertions présentes dans la souche EDL933 et absentes chez MG1655 sont nommées « O island » (OI), îlots O. Ces îlots totalisent 1,34 Mb d'ADN pour 177 de plus de 50 pb. Ils comprennent 26% des gènes (1 387/5 416); 40% peuvent se voir associer une fonction putative et 24% seraient des gènes phagiques (195). Sur les 177 îlots O, 59 ne codent que pour des gènes ayant une fonction inconnue.

Il y a 9 îlots O assez larges qui font plus de 15 kb (OI-7, 28, 43, 47, 48, 115, 122, 138, 148) et parmi ceux-ci on retrouve le LEE (OI-148) ainsi que le système de sécrétion de type III inactif ETT2 (OI-115). Les îlots O moins grands codent aussi pour des facteurs de virulence importants comme les Shiga toxines (OI-45, 93), des fimbriae (OI-61, 141, 154) et des systèmes de capture du fer (OI-20, 55, 123, 140). Ces différents facteurs de virulence ont été ou vont être discutés plus en détails dans d'autres sections.

Une étude incluant plusieurs souches de STEC a démontré que le développement d'une épidémie ou d'une maladie grave était en corrélation avec la présence de l'îlot 122 (124). Chez les souches EHEC O26, cet îlot a aussi été associé avec des complications majeures suite à une infection (22). L'OI-122 possède 26 cadres de lecture ouverts dont

13 associés avec des éléments mobiles. Les 13 autres comprennent 9 gènes de fonctions inconnus et 4 ayant une homologie avec des gènes de virulence connus : *pagC*, *sen*, *efa1*, *lifA* (124).

L'apport d'un îlot O dans la pathogenèse est parfois difficile à déterminer, car la composition de ceux-ci peut varier d'une souche à l'autre. Chez la souche EDL933, les OI-43 et OI-48 sont identiques tandis que chez la souche Sakai, il n'y a pas de duplication. L'OI-122 est très présent chez les AEEC et dans plusieurs de ces souches l'îlot O est fusionné avec la OI-148 (LEE), sauf chez *E. coli* O157:H7. OI-122 aurait donc connu un épisode de recombinaison chez *E. coli* O157:H7 qui lui aurait permis de se séparer du LEE (172). Le OI-122 se retrouve aussi partiellement chez la souche *E. coli* O113:H21 fusionné avec une portion du OI-48 ainsi que d'autres gènes homologues à certains facteurs de virulence de *Yersinia pestis* (225). Les îlots de pathogénicité ne sont donc pas statiques, mais forment plutôt des structures en mosaïque comme les plasmides. La présence de facteurs de virulence dans plusieurs souches situées sur différents îlots O suggère l'importance de ces gènes pour la survie et la propagation des bactéries. L'apport dans la virulence de l'OI-122 n'a pas encore été déterminé, mais il est un bon candidat pour des études plus poussées. En plus de l'apport certain pour la compréhension du mécanisme de pathogenèse, l'étude des îlots O peut aussi permettre le développement d'outils diagnostiques précis différenciant des souches génétiquement rapprochées, mais causant ou non de sévères complications lors d'une infection (116).

1.3.6 L'approvisionnement en fer

Dans un environnement aérobie, le fer est principalement présent sous sa forme Fe^{3+} , le fer ferrique, qui est pratiquement insoluble à un pH neutre. La forme Fe^{2+} , le fer ferreux, est assez soluble à pH neutre, mais est présent en très petite quantité. De plus, le fer ferreux peut être dangereux pour la bactérie en formant des composés toxiques comme des radicaux hydroxyles en réagissant avec du superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène (9, 98). La bactérie doit réussir à assurer sa demande en fer tout en évitant la formation de radicaux toxiques en cas d'une trop forte absorption. Contrairement aux

composés organiques, les minéraux ne peuvent pas être synthétisés par la bactérie et doivent être acquis directement de l'environnement. Lorsqu'il y a un surplus de fer, la bactérie peut faire des réserves et sécrète la ferritine qui est une molécule permettant d'emmagasiner le fer (110). Malgré cette légère capacité de réserve, les bactéries doivent constamment réguler leur absorption de minéraux et principalement, de fer. La recherche de fer est particulièrement importante pour les souches pathogènes, car l'hôte le séquestre dans des protéines (lactoferrine, transferrine) afin de diminuer sa disponibilité. Ce moyen de défense innée doit être contourné par les bactéries, car la concentration de fer descend à environ 10^{-18} M chez l'hôte, ce qui est largement insuffisant pour supporter la croissance bactérienne qui est de 10^{-7} M (28, 146). L'acquisition de fer est cruciale durant une infection intracellulaire et particulièrement dans les macrophages, parce que l'hôte et la bactérie compétitionnent pour les mêmes ions (121). Cependant, il ne faut pas oublier que même les microorganismes non pathogènes ont besoin de fer. Les systèmes de capture de fer participent à la virulence en optimisant l'acquisition de ce métal et facilitant ainsi la croissance bactérienne, mais cette habilité n'est pas retrouvée que chez les bactéries pathogènes (167).

1.3.6.1 Les perméases

Le moyen le plus simple d'internaliser des molécules est d'utiliser des perméases. Ce sont des protéines membranaires de haute ou basse affinité pour un substrat spécifique qui peuvent ou non utiliser l'ATP. La première perméase pour le fer ferreux découverte est Feo. Cette perméase est codée par les gènes *feoA* et *feoB* (122). Elle serait très importante dans un environnement anaérobie où le fer ferreux serait accessible en plus grande quantité. Une mutation dans ces gènes entraîne une atténuation de la colonisation de l'intestin chez la souris par *E. coli* K-12 (101) prouvant ainsi son importance dans la colonisation de l'hôte. MntH, le système de transport du manganèse proton-dépendant, peut aussi transporter du fer ferreux, mais avec une affinité moins grande. Il fait partie de la famille des NRAMP (« natural resistance-associated macrophage proteins ») (154). ZupT transporte principalement du zinc, mais peut aussi transporter du manganèse, du fer et du cobalt. Son expression est constitutive et suffisante pour approvisionner la cellule en fer dans un milieu pauvre même si les autres

perméases et sidérophores sont mutés (87). Son apport est donc significatif pour la bactérie, mais il ne faut pas oublier que ces différents systèmes sont redondants et qu'un seul d'entre eux peut être suffisant pour la survie de la bactérie. Il est intéressant de noter que l'utilisation des perméases à fer ferreux peut être optimisée lorsque la bactérie sécrète des réductases de fer ferrique augmentant ainsi la quantité de fer ferreux à proximité de la bactérie (266). Aucun gène n'a cependant été associé à cette enzyme.

1.3.6.2 Les sidérophores

Les sidérophores sont des complexes de faibles poids moléculaires excrétés par la bactérie et qui ont une haute spécificité et affinité pour les ions ferriques, Fe^{3+} . L'entérobactine est le sidérophore le plus répandu chez les *E. coli* pathogènes ou non. Deux autres sidérophores, le colibactine et l'aérobactine, sont aussi répandus, mais ne sont pas présents chez la souche *E. coli* O157:H7 (133). L'entérobactine est codée par les gènes *entABCDEF* qui codent pour des enzymes permettant la transformation de l'acide chorismique en entérobactine par de multiples réactions enzymatiques (204). L'entérobactine ne pourrait théoriquement pas sortir de la cellule par diffusion, mais aucun mécanisme n'a été identifié comme permettant son exportation. Un gène, *entS*, pourrait être impliqué dans l'export de l'entérobactine, mais son importance réelle reste incertaine (71). Une fois à l'extérieur de la cellule, l'entérobactine (Ent) va se lier au Fe^{3+} et le complexe Fe-Ent va être reconnu par une protéine de la membrane externe, FepA. Ensuite, le complexe va traverser le périplasme en se liant à FepB qui va le porter aux protéines membranaires FepG et FepD. Afin de transloquer le complexe dans le cytoplasme, FepC va hydrolyser une molécule d'ATP. Le fer se retrouve donc dans le cytoplasme où il peut être utilisé par la bactérie. L'entérobactine peut ensuite retourner dans le milieu externe afin de lier d'autres molécules de fer ferrique (204).

Ce système demandant beaucoup d'énergie et le fer étant un composé extrêmement important pour la cellule, les gènes de transport et de synthèse de l'entérobactine sont étroitement régulés. Un régulateur important en anaérobiose est Fur (« ferric uptake regulator ») (101). Lorsque la concentration en fer est élevée à l'intérieur de la bactérie, Fur va lier le Fe^{2+} et réprimer la transcription des gènes permettant

l'assimilation du fer comme *ent* et *fep*. Il va aussi réguler positivement l'expression des gènes assimilant le fer grâce à la répression d'un sRNA (« small RNA ») RyhB (158). RyhB augmente la vitesse de dégradation des ARNm des gènes dont l'expression est positivement régulée par Fur par exemple, SodC qui code pour une superoxyde dismutase (159). L'expression du gène *fur* lui-même serait régulée par la concentration de protéine Fur dans le cytoplasme ainsi que par deux grands régulateurs de stress oxydatif OxyR et SoxRS (281).

Lors d'une infection, afin de se protéger, les mammifères vont limiter encore plus la disponibilité du fer ferrique en augmentant la production de lactoferrine et de ferritine, mais peuvent aussi sécréter via les neutrophiles, la protéine Lcn2 (52, 121). Cette protéine va lier le complexe Fe-Ent empêchant ainsi la bactérie de recapturer le complexe et en extraire le fer. Certaines bactéries pathogènes ont donc modifié leurs sidérophores, comme *Salmonella* et les UPEC possiblement pour contrevenir à ce phénomène et acquérir le fer dont elles ont besoin (63). Par contre, aucune modification de l'entérobactine n'est connue chez *E. coli* O157:H7.

1.3.6.3 Hème et hémoglobine comme source de fer

Les principales protéines de l'hôte séquestrant le fer sont la lactoferrine, la transferrine, l'hème et l'hémoglobine. Comme *E. coli* O157:H7 ne produit pas l'aérobactine et est incapable d'utiliser le fer de la lactoferrine et de la transferrine, les principales sources de fer *in vivo* seraient probablement l'hème et l'hémoglobine (258). *Shigella* est capable de survivre et se multiplier avec l'hème comme seule source de carbone grâce aux gènes *shu* (« *Shigella* heme uptake »). Des gènes ayant une forte homologie à celui-ci sont aussi présents chez *E. coli* O157:H7, ce qui permettrait d'utiliser l'hème comme source de fer (169). Ces gènes ont été dénommés *chu* (« *E. coli* heme uptake »). Chez une souche pathogénique aviaire de *E. coli*, *chuA* est exprimé *in vivo* et a été identifié grâce à la technique STM (voir section, 1.4.1.1). Lors d'une expérience *in vivo* en compétition de survie, la virulence du mutant *chuA* était diminuée comparativement à la souche sauvage indiquant le rôle important de ce système de transport du fer (145). Le système Chu a aussi été détecté à deux reprises comme étant

exprimé *in vivo* chez les UPEC (97, 232). Un système analogue serait aussi présent chez *Yersinia pestis*, les gènes *hmu* (276).

La présence d'hème ou d'hémoglobine va stimuler la croissance des souches O157 et va être fortement liée avec la présence d'entérohémolysine, ce qui n'est pas le cas chez les souches non-O157 (139). Cette corrélation est cohérente avec les faits pendant l'infection. Pendant l'infection, la relâche des toxines va causer des dommages à l'épithélium intestinal entraînant des saignements (262). La transcription de la toxine Stx1 est régulée par Fur et va être augmentée en absence de fer (31). L'entérohémolysine peut agir ensuite en lysant les érythrocytes relâchant une grande quantité d'hème et d'hémoglobine dans l'environnement immédiat des bactéries. Grâce aux gènes *chu*, la bactérie va pouvoir utiliser ces complexes protéines-fer de l'hôte, croître et assurer sa survie.

Les gènes *chuASTWXYUV* sont situés sur un petit îlot de pathogénicité, OI-140 et leur expression est régulé par Fur (169, 195). Ils auraient probablement été acquis par transfert horizontal tout comme les gènes *shu*, mais aucun indice de transfert horizontal commun n'a été retrouvé. ChuA serait un récepteur-TonB dépendant liant l'hème et sa seule présence serait suffisante pour l'utilisation de l'hème comme source de fer chez *E. coli* K-12 (169, 276). L'hème pourrait donc être transporté à l'intérieur de la cellule par un moyen non spécifique. Une fois à l'intérieur, le fer doit être séparé de son complexe, ce qui est effectué par ChuS, une hème oxygénase. Cet enzyme va dégrader l'hème en biliverdine, en monoxyde de carbone et en fer libre. La dégradation de l'hème est importante pour l'acquisition de fer, mais aussi pour empêcher sa toxicité. En effet, l'hème est un composé de faible poids moléculaire qui pourrait s'insérer dans les membranes en plus de former des radicaux libres (240). La bactérie doit donc réguler minutieusement les systèmes de transport d'hème tout comme ses autres systèmes de transport du fer.

1.3.6.4 Autres systèmes transportant le fer

Il y a plusieurs systèmes potentiels de transport de fer qui n'ont pas encore été totalement caractérisés. Le système Fit (« ferrous or ferric iron transport ») a été identifié dans une souche *E. coli* O25 :H⁻ causant des septicémies nosocomiales chez l'humain. Ce nouveau système a été découvert grâce à une méthode d'identification des gènes exprimés *in vivo* lors d'une infection de souris (IVET, voir section 1.4.1.2) (129). On ne sait pas encore de quelle façon ce système permet l'acquisition du fer, mais la possibilité de liaison au ferrichrome, à l'entérobactine ou au citrate ferrique a été écartée. L'expression de ce système serait régulé par Fur ainsi que par le peroxyde d'hydrogène (190). Ce système est aussi retrouvé chez les UPEC, au même emplacement que celui des *E. coli* O157:H7.

Malgré tous les systèmes d'acquisition de métaux, il est cependant possible qu'il y ait un excès de métaux dans le cytoplasme; il faut alors détoxifier la bactérie. Un système de transport du fer va être utilisé, cette fois c'est un antiport proton-dépendant. FieF (« ferrous iron efflux ») va pouvoir débarrasser la cellule lors d'une accumulation de fer ou de zinc évitant ainsi la production de composés potentiellement toxiques pour la cellule (88). L'expression de ce système est régulé par le fer, mais sa transcription ne semble pas modifiée par Fur.

1.4 LES ÉTUDES D'EXPRESSION GÉNIQUE *IN VIVO*

Un des buts principaux lorsque l'on étudie un microorganisme pathogène est d'identifier ses facteurs de virulence afin de comprendre comment il établit une infection et cause la maladie. Il est plus facile d'élaborer un moyen de défense lorsque les étapes clés d'une infection sont caractérisées. Dans cette optique, les gènes exprimés *in vivo* sont de première importance et leur identification peut entraîner la découverte de nouveaux gènes de virulence et permettre de cibler pour de futurs antibiotiques, vaccins ou médicaments. Cependant, il est assez difficile d'identifier des gènes exprimés seulement *in vivo*. Les études en laboratoire, *in vitro*, ont tout de même permis d'identifier quelques gènes de virulence en mimant des conditions *in vivo*. La

transcription génique des bactéries pathogènes confrontée à différents milieux était étudiée : la concentration en fer, l'osmolarité, le pH, la présence de bile, la quantité d'oxygène et la température (205). Ces dernières années, des techniques permettant l'identification de gènes transcrits *in vivo*, dans l'environnement complexe de l'hôte, ont été développées : STM, (106), IVET (151), IVIAT (100) et SCOTS (43). Ces méthodes permettent l'identification de gènes de virulence inconnus ouvrant la voie à une compréhension accrue des mécanismes d'infection *in vivo*.

Lorsqu'une bactérie pathogène de l'homme est étudiée, de nombreux obstacles doivent être surmontés. Si la bactérie est spécifique à l'homme, l'utilisation d'un modèle animal n'est pas toujours concluante lorsque disponible. Une souche apparentée possédant des propriétés similaires à la souche peut être utilisée, mais il faut s'assurer que la maladie causée chez le modèle animal soit semblable à celle causée chez l'homme afin que l'étude soit valable. Si l'on tient absolument à travailler avec la souche spécifique aux humains, des lignées de cellules humaines immortalisées peuvent toujours être utilisées. Une autre possibilité est de recueillir du sang humain infecté et d'étudier la composition de ses anticorps, ce qui sera discuté plus loin (100).

1.4.1 STM, IVET et IVIAT

1.4.1.1 «Signature-tagged mutagenesis» (STM)

La méthode STM permet de sélectionner des gènes qui sont essentiels lors d'une infection *in vivo*. Lorsque la bactérie ne possède pas ce gène, elle ne pourra pas survivre dans l'hôte. La méthode consiste à construire une banque de mutants par insertion de transposons possédant tous une étiquette (« tag ») différente. Chaque mutant est placé dans un puits de plaque 96 puits. Un répliquat d'ADN est effectué sur l'ensemble des mutants lorsque ceux-ci sont en milieu de culture, ceci représente le témoin *in vitro*. Les mutants vont ensuite être tous inoculés au même animal. Un deuxième répliquat d'ADN sur la condition *in vivo* est effectué : si un mutant est retrouvé *in vitro*, mais pas *in vivo*, le gène muté est essentiel à la virulence (106). Cette technique a été validée avec la bactérie pathogène *Salmonella* Typhimurium; plusieurs gènes de virulence connus ont été identifiés ainsi qu'un deuxième SST3, le SPI-2 (224). Depuis, plusieurs bactéries

Gram négatif et positif ainsi que des mycobactéries et des virus ont été étudiés grâce à cette technique. Chez les *E. coli* pathogènes, plusieurs facteurs de virulence ont été détectés *in vivo* grâce à cette technique : ChuA (145), le LEE (54, 264), HlyA (264), F9 (54, 149) et le fimbriae de type 1 (13).

Les avantages sont certains, mais la méthode comporte tout de même quelques inconvénients. La construction d'une banque de mutants implique l'utilisation d'outils moléculaires permettant la création de mutants relativement facilement. Certains microorganismes moins étudiés, un système expérimental de mutations par transposons n'a pas encore été découvert. De plus, un modèle animal doit être disponible, ce qui n'est pas toujours le cas. Ce modèle doit aussi permettre la récupération d'un nombre suffisant de bactéries afin d'avoir une vision non biaisée des résultats, ce qui peut s'avérer parfois difficile (12). La méthode est assez fastidieuse et demande beaucoup de travail pour une liste parfois assez courte de facteurs de virulence possibles. Il y a aussi possibilité de complémentation entre les différentes souches durant l'infection *in vivo*. Par exemple, un mutant déficient pour la synthèse de sidérophore peut capturer ceux d'autres bactéries; un mutant incapable de former des lésions permettant sa pénétration dans les tissus va pouvoir utiliser les lésions causées par d'autres bactéries. La redondance peut aussi empêcher l'identification de gènes importants, car la fonction de ceux-ci va être complétée par d'autres systèmes analogues, ou encore une duplication de ces mêmes gènes dans le chromosome (13). Cette méthode n'est donc pas parfaite, mais permet tout de même de faire des avancées en recherche sur les gènes de virulence requis *in vivo*.

1.4.1.2 «*In vivo* expression technology» (IVET)

La technique IVET consiste en la sélection de promoteurs induits *in vivo* dans l'hôte, mais réprimés lors de condition *in vitro* de laboratoire. Une banque de promoteurs couplés au gène *purA* et *lacZ* clonés sur un plasmide suicide va être introduite dans une souche auxotrophe pour la purine. La souche va pouvoir croître dans un milieu sans purine, seulement si le promoteur est induit et le gène *purA* transcrit. La banque de souches est introduite dans l'hôte qui offre un environnement sans purine. Les

seules souches qui survivent sont celles dont les promoteurs vont être induits *in vivo*. Ces souches croissent ensuite dans le milieu *in vitro* et les souches possédant des promoteurs non induits dans ce milieu vont être sélectionnées grâce au gène *lacZ* (151). Cette technique a permis d'identifier l'expression préférentielle *in vivo* de plusieurs gènes de virulence présumés ou établis comme *phoP* et *entF* chez *S. Typhimurium* (105). La technique a aussi été utilisée pour *Klebsiella*, *Actinobacillus* et *E. coli* (70, 129, 135). Chez *E. coli*, un nouveau système de transport du fer, *fit*, a été identifié chez le sérotype O25 :H⁻, ayant un homologue chez *E. coli* O157:H7 (voir section 1.3.6.4) (190).

Cette technique présente plusieurs désavantages. La méthode est assez fastidieuse, car une banque de promoteurs doit être construite. Le choix de la condition *in vitro* est d'une importance capitale et va influencer les gènes sélectionnés. De plus, les gènes identifiés ne sont pas tous des facteurs de virulence essentiels au bon établissement de l'infection. Plusieurs gènes peuvent aussi se retrouver dans des processus métaboliques, ce qui n'est pas nécessairement recherché lorsque l'on utilise une technique de ce type. Plusieurs gènes extrêmement importants pour la virulence peuvent être induits seulement de façon transitoire. Dans ce cas, les promoteurs ne seront pas induits sur une assez longue période de temps pour permettre une complémentation efficace permettant la survie de la souche. Ces gènes ne pourront pas être identifiés (10).

1.4.1.3 «*In vivo* induced antigen technology» (IVIAT)

Les méthodes STM et IVET sont très efficaces, malgré leurs désavantages respectifs. Cependant, ces deux techniques nécessitent le recours à un modèle animal, ce qui n'est pas toujours possible lorsque l'on travaille avec une bactérie spécifique aux humains. Afin de contrer ce problème et recueillir quelques informations sur les gènes possiblement exprimés lors de l'infection *in vivo*, la technique IVIAT peut être utilisée. Le sang du patient est recueilli et ses anticorps sont isolés. Ces anticorps vont être mis en contact avec les antigènes de la bactérie en condition *in vitro*. Les cibles antigéniques des anticorps vont être identifiées et leur rôle dans la pathogenèse va pouvoir être étudié

(212). Cette technique a été utilisée avec de multiples microorganismes pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Candida albicans*, *Salmonella Typhi* et *Escherichia coli* (35, 48, 119, 233). Le principal problème de cette technique réside dans le fait que seule la réponse humorale est étudiée et bien que les protéines semblent exprimées *in vivo*, elles ne sont peut-être pas d'une importance capitale lors d'une infection. Plusieurs protéines d'*Escherichia coli* O157:H7 ont été détectées en utilisant cette technique. Certains sont des facteurs de virulence connus comme l'intimine, mais la plupart sont reliés au métabolisme. De plus, plusieurs gènes n'ayant pas de fonction connue présents sur les îlots O ont été identifiés. Des investigations seraient nécessaires pour tirer des conclusions intéressantes sur ces découvertes (119).

1.4.2 « Selective capture of transcribed sequences » (SCOTS)

La technique SCOTS a été développée afin de permettre l'étude de l'expression génique bactérienne. L'ARN messager (ARNm) bactérien est très instable, a une courte demie-vie, ne possède pas de queue poly-A et représente une faible proportion de l'ARN bactérien total (85). SCOTS permet de contourner ces problèmes et d'étudier l'expression de gènes *in vitro* ou *in vivo*. Contrairement aux méthodes STM et IVET, il n'y a aucune banque à construire et les résultats obtenus ne dépendent pas de la réaction de l'hôte comme dans IVIAT. Cette méthode peut être adaptée à différentes situations autre que l'expression de gènes *in vivo* comparativement à *in vitro* : découvrir des gènes uniques à une souche pathogène comparativement à une autre (173) ou encore, identifier des gènes exprimés dans une condition *in vitro* comparativement à une condition contrôle (85, 147). Ces différentes approches possibles sont un avantage, car il est primordial d'avoir des modèles animaux valides ou encore des cultures de cellules adéquates pour pouvoir appliquer STM ou IVET (175). Le principal avantage de SCOTS est donc la liberté d'application de la technique. La technique SCOTS a été choisie pour l'étude de plusieurs microorganismes pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* (85, 104, 109), *Salmonella Typhi* et *Typhimurium* (42, 60, 61, 173), *Listeria monocytogenes* (147), *Helicobacter pylori* (86), *Escherichia coli* (53, 142), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (15) et *Streptococcus suis* (64). SCOTS permet la

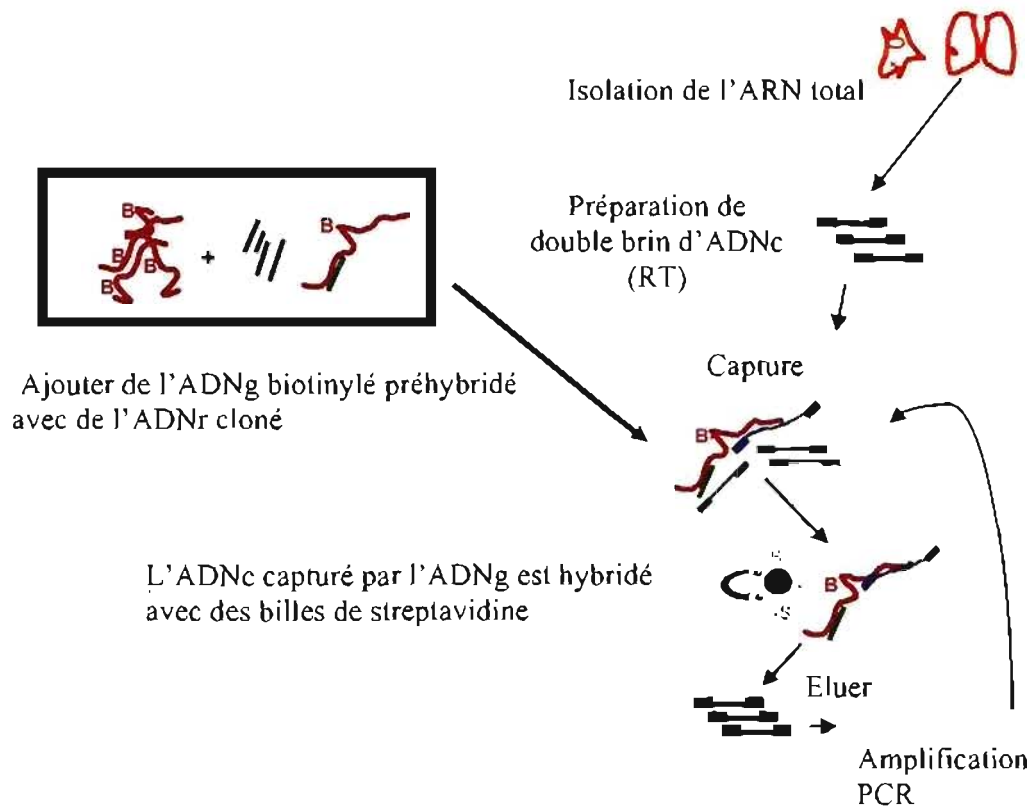


Figure 9: Technique de SCOTS (adapté de Graham, 1999)

capture d'ADN complémentaire (ADNc) correspondant aux ARNm des bactéries dans une condition donnée. Brièvement, l'ARN total est extrait des cellules ou tissus infectés et transformé en ADNc par transcriptase inverse (en bleu dans la Fig 9). Une amorce avec une extrémité 5' déterminée (étiquette) et 9 nucléotides aléatoires en 3' est utilisée afin d'étiqueter l'ADNc. À cette étape, les transcrits de l'hôte ainsi que ceux de la bactérie sont mélangés. L'étape de capture s'effectue en sélectionnant positivement l'ADNc bactérien. Pour ce faire, de l'ADN bactérien génomique (ADNg) est biotinylé (en rouge dans la Fig 9) et incubé avec de l'ADN bactérien ribosomal non-biotinylé (en vert dans la Fig 9). Les sites d'ADN ribosomal de l'ADNg sont bloqués par la présence d'ADN ribosomal non-biotinylé. La capture d'ADNc ribosomal est donc évitée, ce qui est très intéressant, car l'ARN ribosomal représente plus de 80% du total d'ARN. L'ADN génomique biotinylé est mis en contact avec l'ADNc bactérien et celui de l'hôte. La biotine possède la capacité de se lier avec la streptavidine de façon très efficace. Une fois l'ADNc hybridé à l'ADN génomique biotinylé, des billes de streptavidine seront utilisées afin de sélectionner positivement l'ADNc bactérien. De

plus, l'ADNc correspondant aux ARNm de la cellule hôte eucaryote ne peut pas être sélectionné, car il n'est pas complémentaire à l'ADNg bactérien. L'ADNc correspondant aux ribosomes ne peut pas se lier non plus, car les sites correspondant sont bloqués par de l'ADN ribosomal non-biotinylé. Seuls les ADNc correspondant aux ARNm bactériens vont être élués et amplifiés grâce aux étiquettes placées suite à la préparation d'ADNc. Trois rondes de capture sont effectuées pour s'assurer de la pureté et augmenter la complexité des transcrits bactériens. L'ADNc recueilli suite à ces étapes peut être cloné dans des vecteurs et séquencé afin de connaître les gènes étant exprimés dans le modèle utilisé.

Outre le clonage et le séquençage, il est possible d'utiliser le produit de SCOTS couplé avec des biopuces. Cette approche permet une analyse beaucoup plus globale du microorganisme en réaction à son environnement. Plusieurs voies métaboliques peuvent être étudiées à la fois et il est aussi possible d'observer l'expression différentielle des gènes sous différentes conditions. Cette approche a permis l'identification de gènes de virulence déjà caractérisés validant ainsi la méthode (61). L'utilisation de la technique de SCOTS couplée aux biopuces permet donc une étude globale des transcrits d'ARNm lors d'une infection *in vivo*.

1.4.3 Biopuces

Les biopuces permettent de mesurer le niveau d'ARNm de milliers de gènes à la fois afin de pouvoir étudier de façon globale l'activité transcriptionnelle d'une bactérie. Cette technologie a permis l'étude de l'expression génique de *E. coli* O157:H7 dans différentes conditions par exemple, soumise à une très haute pression (155), exposée à un niveau subléthal de norfloxacine (107) ou en contact avec des érythrocytes de lapin (41). Les informations fournies peuvent participer à augmenter la compréhension de la pathogenèse et ultimement, développer un médicament ou un vaccin. Par contre, ces techniques produisent une quantité phénoménale de données qu'il faut bien sûr trier, comprendre et analyser. Les bioinformaticiens et les statisticiens deviennent alors des alliés indispensables pour le microbiologiste.

Il existe peu d'études d'expression génique *in vivo* utilisant les biopuces, car il est très difficile d'obtenir l'ARNm des bactéries. L'ARNm des bactéries est mélangé à celui de l'hôte, à une très grande quantité d'ARN ribosomal, est présent en faible quantité et leur demie-vie est très courte (108). Pour contrer ces problèmes, les chercheurs utilisent différentes approches telles que la lyse différentielle, qui consiste à lyser les cellules de l'hôte avant de lyser les bactéries ou ils modifient leurs paramètres d'infection pour augmenter le nombre de bactéries par cellule, ce qui n'est pas représentatif d'une véritable infection (58, 242). Comme vu précédemment, ces problèmes sont réglés suite à l'utilisation de la technique de SCOTS. La combinaison des techniques de SCOTS et des biopuces est tout indiquée pour étudier le transcriptome bactérien lors d'une infection intracellulaire.

Il existe bien sûr des biopuces pour les eucaryotes. Dans ce cas, l'extraction de l'ARNm est facilitée par la présence d'une queue poly-A et par l'utilisation d'une amorce dT permettant une amplification des transcrits (174). Cette méthode d'amplification ne peut pas s'appliquer aux microorganismes à cause de l'absence ou la rareté de polyadénylation des transcrits bactériens.

Plusieurs autres applications sont possibles pour les biopuces. Elles peuvent être utilisées pour étudier l'évolution des espèces (280), pour l'identification de souche ou l'étude de la dispersion de facteur de résistance aux antibiotiques (99). L'utilisation de cet outil très important est de plus en plus répandue et espérons que de multiples nouveaux usages pourront être développés. Les biopuces ont réellement joué un rôle déterminant dans l'évolution de la science des dix dernières années.

2. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

La bactérie *Escherichia coli* O157:H7 est une bactérie pathogène importante qui cause plusieurs milliers d'infections chaque année. Cette bactérie s'établit dans l'intestin où elle adhère spécifiquement aux plaques de Peyer's. Le système immunitaire de l'hôte et principalement les phagocytes ont pour rôle de détruire les bactéries extracellulaires pouvant causer des infections. Plusieurs espèces de bactéries extracellulaires survivent dans les phagocytes offrant ainsi une résistance au système immunitaire de l'hôte.

L'hypothèse principale de ce mémoire est que les bactéries *E. coli* O157:H7 peuvent survivre dans les macrophages humains permettant ainsi d'augmenter leur survie et leur persistance dans l'organisme. Plusieurs facteurs de virulence importants pourraient être exprimés par la bactérie afin de survivre.

Le premier objectif était d'évaluer la capacité de survie de *E. coli* O157:H7 dans les macrophages humains. Les macrophages THP-1 dérivés d'un lymphome humain sont utilisés ainsi que la souche de référence EDL933.

Le deuxième objectif était de déterminer le profil transcriptomique global de la souche en contact avec les macrophages humains grâce à une combinaison des techniques de SCOTS et des biopuces. Les gènes surexprimés ou réprimés seront identifiés permettant ainsi de mieux comprendre l'interaction entre la bactérie et le macrophage.

3. PUBLICATION

Le Chapitre 3 de mon mémoire contient un article en préparation qui sera soumis au journal « PNAS » ou « Infection and Immunity ».

Poirier, K., Faucher, S., Harel, J., and Daigle, F. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. (En préparation)

Contribution des auteurs :

Les diverses expérimentations, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article ont été effectuées par Katherine Poirier. Sébastien Faucher a fourni un support technique. Josée Harel, Roland Brousseau et Victor Gannon ont fourni un support matériel. Josée Harel ainsi que France Daigle ont fourni un support financier. Josée Harel, France Daigle et Christine Martin ont élaboré la conception expérimentale et ont participé à la rédaction de l'article.

***Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: Involvement of the Shiga toxins and global gene expression profile**

Katherine Poirier¹, Sébastien P. Faucher¹, Roland Brousseau², Vic Gannon³, Christine Martin⁴, Josée Harel⁵ and France Daigle^{1*}

¹ Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

² Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2

³ Laboratory for Foodborne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, Lethbridge, Alberta, Canada T1J 3Z42;

⁴ Institut National de la Recherche Agronomique, UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

⁵ Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal, C. P. 5000. St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6.

* For correspondence. E-mail: [information retirée / information withdrawn] ; Tel. [information retirée / information withdrawn] ; Fax

[information retirée / information withdrawn]

Running title: EHEC survives within macrophages

Keys Words: *Escherichia coli*, transcriptome, macrophage, pathogenesis, Shiga toxins

3.1 ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is an important food borne pathogen that specifically binds to the follicle associated epithelium in the intestine, which will likely bring rapidly this bacterial pathogen in contact with underlying human macrophages. There is very few information available about the interaction between *E. coli* O157:H7 and human macrophages. We evaluated the phagocytosis and survival level of the wild-type strain and two isogenic Shiga toxins mutants during infection of human macrophages. Interestingly, the wild-type bacteria survive and multiply in human macrophages 24 h post-infection. The phagocytosis level of the two isogenic Shiga toxins mutants were higher than the wild-type, however the survival rates were significantly lower 24 h post-infection. Thus, Shiga toxins are implicated in the interaction between *E. coli* O157:H7 and human macrophages. The global gene expression profile of this pathogen during macrophage infection was determined using the selective capture of transcribed sequences in conjunction with microarrays. Inside human macrophages, up-regulation of *E. coli* O157:H7 genes encoded on O islands was observed, such as *pagC* and two iron transport systems, *fit* and *chu*. Genes involved in resistance to acidity were up-regulated. However, genes involved in peroxide resistance or in the SOS response were not differentially expressed, except *recA* was up-regulated. Many genes with putative or unknown function were also up-regulated inside human macrophages and might be new virulence factors. Microarray results were corroborated by real-time quantitative PCR. Understanding the molecular mechanisms used by *E. coli* to survive within macrophages may help for the development of therapeutic targets.

3.2 INTRODUCTION

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) cause an acute gastroenteritis, bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and severe complications develop in up to 10% of cases, including the hemolytic uremic syndrome (HUS) which can be fatal (41, 48). EHEC share their genetic backbone with the laboratory strain K-12, and also contain 1.34 Mb of extra genetic material called O islands (OI) (42). In the EHEC strain EDL933 (O157:H7), 177 O islands were identified, some of them harbor important known virulence factors of EHEC, such as the locus of enterocyte effacement (LEE) and two different Shiga toxins, Stx1 and Stx2. Following the ingestion of contaminated food or water, EHEC enter the gastro-intestinal tract, survive the acidic conditions of the stomach and are released in the intestine (16). Adhesion of the bacteria to the intestinal wall is the first step in establishing infection. The LEE encode for a type three secretion system (T3SS) that inject effectors in host epithelial cells, creating an intimate binding, an actin rearrangement and microvilli effacement, which result in the pathologic lesions called A/E, for attachment and effacement (18). In the large intestine, EHEC specifically adheres to the follicle-associated epithelium (FAE) of Peyer's patches (43). Binding at FAE results in the rapid contact of *E. coli* O157:H7 with underlying human macrophages, but there is very few information available about the interaction between EHEC and these cells. The interaction between EHEC and murine macrophages was investigated and it was shown that phagocytosis of EHEC by murine macrophages caused several actin rearrangements surrounding the phagosome, EHEC was rapidly killed and the Shiga toxins were highly produced (46). However, to our knowledge, the interaction between EHEC and human macrophages has not been investigated. This interaction could be important in the global pathogenesis of EHEC during human infections.

One way to understand host-pathogen interaction is to dissect the molecular mechanisms by studying gene expression. There are very few studies on the transcriptional response of bacteria during infection as there are many factors that complicate bacteria RNA isolation in infected host cells or tissues, such as the low

amount of bacterial RNA *in vivo*, the short half-life of bacterial mRNA, and the contamination of bacterial mRNA with rRNA and host RNA. Moreover, bacterial mRNA purification is complicated by the fact that there are very few bacterial transcripts that are polyadenylated. To overcome these problems, the selective captured of transcribed sequences (SCOTS) was developed to identify bacterial gene expressed during infection (21). This technique has been successfully used with many pathogens like *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Actinobacillus*, *Helicobacter* and *Streptococcus* (4, 5, 8, 12, 15, 22, 27). SCOTS was recently used in combination with microarray in order to provide an effective way to elucidate the global bacterial expression profile or transcriptome from infected host cells (13). Until now, no study has investigated the transcriptome of *E. coli* O157:H7 in contact with human cells. In this report, we characterized the interactions between *E. coli* O157:H7 (EDL933) and human macrophages, evaluate the role of Shiga toxins in the phagocytosis, the survival rates and cytotoxicity and obtained the global bacterial gene expression profile during infection of human macrophages.

3.3 RESULTS

Uptake, survival and multiplication of *E. coli* O157:H7 with human macrophages

The level of phagocytosis and survival of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 in contact with human macrophages was determined (Fig 1A). Twelve percent of the initial bacterial inoculum was associated with the macrophages. The number of bacteria remained relatively constant during the infection, as 70 to 80 % of the associated inoculum survived until 18 h post-infection, then the level of survival decreased to 25% at 24 h post-infection (T24) (Fig 1A). Initially, many macrophages were infected with single or few bacteria, as determined by using a constitutively expressing GFP EDL933 and fluorescence microscopy (SI Fig 1A). Later during the infection, at T24, only few macrophages were infected, but they contained many bacteria found in clusters, suggesting that bacteria had replicated (SI Fig 1B). This observation was then quantified by cytometry in order to estimate the percentage of macrophages infected with GFP bacteria, as well as the mean level of fluorescence. Macrophages infected with EDL933

that do not express GFP were used as a negative control (data not shown). A higher number of fluorescent macrophages (60%) was observed at the beginning of the infection (T0) than at T24 (46%). However, the mean fluorescence at T24 was twice as high as at early time (Fig 1B). Thus, later during infection, less macrophages were infected but contained more bacteria, confirming the fluorescence microscopy data.

Role of Shiga toxins on *E. coli* O157:H7 survival in human macrophages

As the Shiga toxins are very important virulence factors in EHEC, we investigated the impact of Shiga toxins, Stx1 and Stx2, on the phagocytosis, survival and cytotoxicity level of *E. coli* O157:H7 in human macrophages. The absence of either of the Shiga toxins significantly increased the level of phagocytosis compared to the wild-type (Fig 1C). The survival rate of each *stx* mutants significantly decreased at T24 compared to the wild-type and was significantly more affected by the absence of Stx2 than Stx1 (Fig 1C). As the macrophages' viability could be affected by toxins, the cytotoxicity level of infected macrophages was evaluated at T24 by quantifying the release of lactate dehydrogenase (LDH), which is a macrophage cytoplasmic enzyme. We observed a two fold decrease of cytotoxicity with the *stx1* mutant (Fig 1D), whereas cytotoxicity of the *stx2* mutant was similar to that of the wild-type strain (Fig 1D). Shiga toxins are thus involved during macrophages infection: they both reduced bacterial uptake by macrophages and promoted survival. Stx1 is cytotoxic, whereas Stx2 is rather involved in bacterial survival.

Transcriptome of EHEC within macrophages

To determine the global bacterial gene expression profile of *E. coli* O157:H7 in human macrophages, the EDL933 strain was used to infect macrophages as described in the materials and methods. Three intracellular post-infection time points were chosen, 2 h (T2), 8 h (T8) and 24 h (T24). Bacteria grown in RPMI, the culture medium of human macrophages, was used as an *in vitro* control. In order to obtain a complex mixture of bacterial transcripts, three rounds of the selective capture of transcribed sequences (SCOTS) technique were performed on each of these samples, as described previously (9, 21). The bacterial cDNAs obtained were labeled with fluorochrome and hybridized

to the *E. coli* microarray, which include the full genome of EDL933. The percentage of detected genes was approximately 78% for each tested conditions, confirming that SCOTS allowed the recovery of a great complexity of transcripts. The intracellular expression profiles were analyzed by comparison with the expression profile of bacteria grown in RPMI. Approximately 22% of EDL933 genes (1221) were significantly differentially expressed as determined by ANOVA ($P < 0.0001$). For each intracellular times points, approximately 600 genes were up-regulated (11%) and 400 genes down-regulated (7%) (SI Fig 2A). Interestingly, most of the differentially expressed genes showed a similar expression profile, as more than 60% (405) of up-regulated genes and more than 50% (222) of down-regulated were conserved at each of the intracellular time point (SI Fig 2B). Because the transcription profile observed was similar for numerous genes throughout the infection course and that more genes were expressed at T24, our analysis focused mostly on this time point. *E. coli* O157:H7 differentially expressed genes were grouped by their clusters of orthologous groups according to the TIGR annotation (www.cmr.tigr.org) (SI Fig 2C). Profile of highly up-regulated or down-regulated was not found to be specific to a class. The microarrays data were confirmed by qPCR and a correlation of 0.9 was obtained on 6 tested genes (SI Fig 3).

Differential expression of O Islands

O islands represent about 20% of the EDL933 genome and 13% of these genes were up-regulated, whereas 6% were down-regulated at T24. Of the 177 O islands, 13 were selected on the basis that they possessed at least 15% of differentially expressed genes at T24 and harbor at least 6 genes (Fig 2). The OI-148 encoding the LEE did not meet these criteria as only 4 genes were down-regulated (*sepZ*, *espD*, *tir*, and Z5094) and 2 were up-regulated (Z5095, Z5088) on a total of 48 genes. In most of the selected O islands, genes were up-regulated (Fig 2). OI-122, OI-123 and OI-140 contain many genes that were strongly up-regulated. OI-122 contains the virulence gene *pagC*, which was up-regulated at each intracellular time point. The up-regulated genes of OI-123 include the putative iron transport operon *fit* (40) and the up-regulated genes of OI-140 include the iron uptake operon named *chu* (37). In OI-93, harboring genes of phage CP-933V as well as Stx1, more genes were down-regulated than up-regulated, except for

stx1B that was up-regulated. In OI-45 encoding for phage BP-933W and Stx2, genes were mostly up-regulated, including *stx2B*.

Genes involved in stress responses and metal ions availability

As the macrophage environment is hostile, expression of genes involved in the bacterial response to DNA damage (SOS response), to superoxide, to peroxide and acid resistance were analyzed. Some genes related to DNA damage, *recA*, *recB*, *recC*, *recN* ($P < 0.001$), *ruvC*, *dinF* ($P < 0.001$), *dinD* (3) and *sulA* (7, 14) as well as genes involved in superoxide stress, *soxRS*, *hmpA* and *zwf* (44) were up-regulated. The peroxide resistance genes *oxyR*, *katP*, *katE* and *katG* were not differentially expressed. The acid regulators *yhiF* and *gadE* were up-regulated ($P < 0.001$) as well as many acid resistance genes like *hdeA*, *hdeD*, *gadA*, *adiY*, *asr* and *adiC*. Metal ions related genes are important as metal ions are found scarcely in the host. The transcription of *mntH*, *chu*, *fit*, *brfA* and *fieF* were up-regulated in macrophages, but not *feo*, *zupT*, *ent* or *fhu*.

3.4 DISCUSSION

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) of serotype O157:H7 interacts with intestinal cells and causes microvilli effacement, which result in mild to bloody diarrhea. A strong inflammatory response is observed during EHEC infection, and cytokines produced by infected macrophages were previously shown to contribute to the severe inflammation associated with HUS (50). Thus, the interaction between EHEC and human macrophages could be important in the global pathogenesis of EHEC during human infections, but this interaction was not or very poorly characterized. In this study, we have determined the phagocytosis and survival rate of *E. coli* O157:H7 and of its isogenic Shiga toxins mutants during infection of human macrophages as well as the global bacterial gene expression profile. We observed that *E. coli* O157:H7 can survive in human macrophages and were even able to replicate. Although not reported for *E. coli* O157:H7, it was previously shown that some extracellular bacterial pathogens are able to survive within professional phagocytes, such as *E. coli* (UPEC)(38), Group A *Streptococcus* (35, 51, 52), *Staphylococcus aureus* (23) and *Enterococcus faecalis* (4,

19). However, only *E. faecalis* had multiplied slightly in the macrophages 24 h post-infection (19). We showed that EHEC O157:H7 can resist macrophage killing and can also multiply, although the total number of viable bacteria decreased throughout the infection. There may be two distinct populations of bacteria inside the macrophages, one that is able to survive and multiply and another population that is killed. This hypothesis of “double population” has been raised for other pathogens like *E. faecalis*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* (1, 10, 19). Our analysis cannot distinguish between these populations. Yet, EHEC have not been detected in blood or organs and infection do not lead to a systemic infection, but this longer survival lapse of time can be important in the global course of infection such as the inflammatory response.

Shiga toxins are important virulence factors of EHEC that recognize the Gb3 receptor on host cells. It was previously shown that differentiated THP-1 human macrophages express Gb3 (45). The involvement of Shiga toxins in phagocytosis and survival level in THP-1 human macrophages was studied. There is a correlation between level of phagocytosis of EDL933 by macrophages and the presence of Shiga toxins as the Stx mutants are more phagocytosed than the wild-type strain. The Shiga toxins were also involved in bacterial survival in macrophages, as the two Stx mutants showed a lower survival rate than the wild-type. Moreover, the two Shiga toxins have different effects on macrophages. It seems that Stx2 was more important than Stx1 for bacterial survival, as a significant lower level of survival was observed with the *stx2* mutant compared to the *stx1* mutant. However, it seems that Stx1 was more cytotoxic to the macrophages than Stx2, as the *stx1* mutant was less cytotoxic than the wild-type, while the cytotoxicity of the *stx2* mutant towards the macrophages was similar to that of the wild-type strain. Differential activities of the two Shiga toxins have been previously shown on cultured human renal microvascular endothelial cells where Stx2 was 1000 times more cytotoxic than Stx1(32). The mechanism by which toxins influence the survival of *E. coli* O157:H7 and its cytotoxicity on human macrophages remains unknown and more research will be needed to answer this query.

During infection of human macrophages, *E. coli* O157:H7 faces a complex environment and adapts itself, particularly by modifying its global transcriptome in

order to survive and multiply. O islands are regions of the EDL933 genome that are specific to O157 compared to *E. coli* K-12 and some of which encode for virulence determinants. Genes of some O islands were up-regulated in macrophages. The presence of the OI-122 is linked with epidemic and/or serious disease, which suggests that genes of this region could be important for virulence (28) and *pagC* was up-regulated. In *Citrobacter rodentium*, which causes A/E lesions in mice, a *pagC* mutant had a significantly lower competitive index, indicating that this gene is important for the establishment of *in vivo* infection (53). In *Salmonella*, PagC is important for bacterial survival in murine macrophages (36) and its gene transcription was up-regulated in human macrophages (13). Moreover, PagC antibodies were detected in human blood (25). Thus, *pagC* might be involved in survival of *E. coli* O157:H7 in human macrophages.

The iron uptake systems operons *fit* and *chu*, respectively harbored by OI-123 and OI-140, were up-regulated. The *fit* (“ferrous or ferric iron transport”) system was previously found to be expressed during mouse infection with a human strain of *E. coli* O25:H causing septicemia (29). *Chu* is an iron uptake system based on heme and is sufficient for bacterial survival when the heme is the only available iron source (37, 54). In uropathogenic *E. coli*, the transcription of *chuW*, member of the *Chu* system, was found to be up-regulated in the urine of mice and moreover, antibodies against the hemin receptor, *ChuA*, were detected in infected mice (24). In avian pathogenic *E. coli*, a *chuA* mutant did not survive in a chicken infection model (30). These iron uptake genes are then important during *in vivo* infections and may also confer a survival advantage to *E. coli* O157:H7 during macrophage infection. Other metal ions uptake systems are located outside O islands, like *mntH*, *feo*, *zupT*, *ent*, and *fhu*. *MntH* is a metal ion transporter involved in the uptake of Mn^{2+} , specifically in acidic condition, and of Fe^{2+} , to a lesser extent, and was the only ions uptake system up-regulated. Other iron related genes were up-regulated such as *bfrA* and *fieF*. *BfrA* is transcribed under abundant iron conditions and *FieF* is believed to pump iron out from the cytoplasm in the extracellular environment. In human macrophages, *E. coli* O157:H7 did not seem to face limited iron but may use heme or other ions.

In human macrophages, the transcription of phage BP-933W genes, including *stx2B* is induced. In contrast, many genes of phage CP-933V were down-regulated, except for *stx1B* whose expression was up-regulated. The bacteria by infecting and surviving within macrophages face a stress situation that might favor BP-933W induction. The two phages are known to be differentially regulated in stress situation. It was reported that, subinhibitory concentrations of norfloxacin, a gyrase inhibitor, up-regulated the transcription of phage BP-933W but not of phage CP-933V (26).

Genes involved in nucleotide synthesis and in DNA synthesis and repair were up-regulated, which can correspond to the multiplication of the bacteria or its encounter with different stresses. During macrophages infection, some genes, *recA*, *recB*, *recC*, *recN* ($P < 0.001$), *sulA*, *ruvC*, *dinD* and *dinF* ($P < 0.001$) of the SOS response were identified as up-regulated. The repair of DNA by the RecBCD-RuvBC system, which was partially up-regulated, may be sufficient to repair DNA damage and avoid a complete SOS response. We have identified many up-regulated genes that belong to acid resistance systems. The two extreme acid resistance systems, as well as a group of genes called the “acid fitness island” were activated during macrophages infection. Furthermore, it was also observed that some of these acid resistance genes were specifically up-regulated in *Shigella dysenteriae* only in human macrophages (33). *E. coli* O157:H7 may face unsuitable acidic conditions within human macrophages, particularly at late time points, but no peroxide stress as the transcription of critical genes such as *oxyR*, *katP*, *katE* and *katG* did not change.

Some type three secretion systems (T3SS) are implicated in bacterial survival in macrophages, such as the T3SS located on SPI-2 in *Salmonella* (39) or on the plasmid in *Shigella* (2). In enteropathogenic *E. coli* (EPEC), the T3SS system encoded by the LEE was shown to inhibit phagocytosis by murine macrophages and to inhibit uptake by M cells (34), which can be a way of escaping underlying macrophages. Our results show that the majority of LEE genes on OI-148 were not differentially regulated during macrophages infection. Moreover, two genes, *yhiF* and *gadE*, known repressors of the

LEE (49), were up-regulated, suggesting that LEE is repressed and not involved in EHEC survival in human macrophages. Interestingly, up to one third of the up-regulated genes (210) belong to the “Hypothetical / Unknown” group, which could be potentially new virulence genes.

EHEC preferably bind to the Peyer’s patch (43) where they will encounter sub-adjacent macrophages. EHEC infections are known to induce a strong inflammatory response. The presence of EHEC and Shiga toxins in the gut will recruit and activate cells of the immune system. The activated cells produce proinflammatory cytokines that will intensify the inflammatory response that will lead to the disruption of the intestinal barrier, permitting a deeper penetration of the Stx toxins (11). Furthermore, these cytokines have also been shown to increase Gb3 expression on endothelial cells, allowing more binding of Stx, further exacerbating the disease process (31, 50). Thus, the extended survival of EHEC in underlying macrophages could have a double function. First, it enhance inflammatory response implicated in the intestinal epithelial barrier disruption, which leads to an increase of Shiga toxins in blood. Second, the production of Shiga toxins can be amplify by bacteria within macrophages as the Shiga toxins are exocytotically secreted (46). EHEC is able to survive in macrophage with the participation of the Shiga toxins. Understanding interaction between host and pathogen are really important to achieve new therapeutic methods or vaccine development particularly in the case of *Escherichia coli* O157:H7, as no cure is presently available for organisms infected by this bacterium.

3.5 MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

E. coli O157:H7 strain EDL933 (ATCC 700927) and its derivatives were grown routinely in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C. Stx1 and Stx2 isogenic mutants were previously described (20). The EDL933 GFP positive strain was obtained by electroporation of a high copy plasmid constitutively expressing GFP (pKen2) (6).

When necessary, kanamycin (Kn) or ampicillin (Ap) was added to the medium at 50 µg/ml.

Cell culture and infection

The human monocytic cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained and infected as described previously (8). Macrophages were seeded and bacteria were added to the cell monolayer at a multiplicity of infection of 10. After 20 min incubation (T₀), the infected cells were washed and incubated with supplemented medium containing 100 µg/ml of gentamicin for 2 h, then changed to 12 µg/ml to kill extracellular bacteria. The infected monolayers were either lysed from the tissue culture dishes by addition of 0.1% sodium deoxycholate (DOC) in PBS or further incubated. The number of surviving bacteria was determined by bacterial plate counts (CFU). The level of phagocytosis was calculated as a percentage of the initial inoculum. The survival level corresponds to the percentage of intracellular bacteria at different times post-infection compared to the one at T₀. *Salmonella* strain ISP1820 and non-pathogenic *E. coli* strain DH5α were used as positive and negative controls, respectively. For flow cytometry analysis, infections were performed as described above using a GFP positive strain, and without a lysis step. The infected samples were gently scraped and fixed with 4 % formaldehyde. The data from 20 000 acquired events on a BD FACSort was analyzed with the CellQuest program.

Cytotoxicity assay

Human macrophages were seeded in 24-well plates and infected as described above. After 24 h of infection, the supernatant was collected and the amount of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) release was evaluated with the Cytotox96 Kit (Promega) according to manufacturer's instruction. The percentage of cytotoxicity was expressed as $100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$ in which the spontaneous release was the amount of LDH activity in the supernatant of uninfected cells and the maximum when cells were lysed with the provided lysis buffer.

RNA extraction, SCOTS and qPCR

Total RNA was isolated from bacteria grown in the cell culture medium, and from infected human macrophages at 2, 8 and 24 h post-infection in 6-well tissue culture dishes, with TRIzol reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Five µg of each RNA samples were treated with DNase and converted to cDNA as described before using primer containing a defined 5' end and a random nonamer in the 3' end (9, 21)(Table 1). The second strand cDNA was synthesized using the Klenow fragment of DNA polymerase I (NEB) as described by Froussard (17). Enrichment of bacterial cDNA from the mixture of host cDNA and bacterial rDNA was obtained by selective capture of transcribed sequences (SCOTS) as described previously (9, 13, 21). For qPCR analysis, RNA was extracted as described above and reverse transcription was performed in triplicate using SuperScript II (Invitrogen) with random hexamers (Sigma), according to the manufacturer's instructions. qPCR reactions and analysis were performed as previously described (13). *gyrA* was used as the reference gene for normalization. Primers are listed in Table S1.

Microarray, labeling, hybridization, data acquisition and analysis

Corning Ultra-Gap II slides (Corning, Acton, MA) were spotted with the MWG *E. coli* O157:H7 array set (Ocimum). The MWG array consists of 6167 50-mer oligonucleotides covering the genomes of *E. coli* K-12 (MG1655), *E. coli* O157:H7 strains Sakai (RIMD 0509952) and EDL933 (ATCC700927). 5419 genes represent the EDL933 genome, including 83 genes from the plasmid pO157. Four replicates were used for each time point in the microarray experiments and the coefficient of correlation was calculated between each replicate. 400 ng of SCOTS cDNA or genomic DNA was labeled with the Bioprime DNA labeling system kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. SCOTS cDNA was labeled with Cy5 and genomic DNA was labeled with Cy3 (Amersham). The templates were purified and 3 µg of each of labeled SCOTS cDNA and genomic DNA were mixed in warmed DIG hybridization buffer (Roche). The templates were denatured and added to the microarray, which had been pre-hybridized with a DIG-5% BSA buffer. The microarray was incubated at 42 °C for 16 h and was then washed three time in 0.1X SSC-0.1% SDS for 5 min at 37 °C and

one last time in 0.1X The fluorescent images were acquired by ScanArray Lite (Perkin-Elmer) and quantification of fluorescent spot intensities was performed using QuantArray (Perkin-Elmer). Bacterial genomic DNA was used as the reference channel on each slide to allow comparison of each time point and different samples (47). The fluorescence of each spot was expressed as a percentage of the total intensity of the dye for each array. The log ratio (base 2) was used for statistical analysis. A positive signal was determined as at least two-standard deviation superior than the average of spots known to be absent from the EDL933 genome (80 genes). Statistical analysis was performed with Tmev software, by using ANOVA with default parameter (<http://pga.tigr.org>). A *P* value less than 0.0001 was considered statistically significant. Only the significant genes were considered for further studies, unless indicated. Moreover, to be considered as up-regulated or down-regulated gene, the expression of a significant gene need to be two times superior or inferior to the expression level in the control condition.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Strategic Grant (to J.H.) and Discovery Grant (to F.D.). S.P.F. was supported by a scholarship NSERC and K.P was supported by a scholarship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Figure Legend

Fig 1: A) Percentage of phagocytosis (percentage of the initial inoculum that is associated with macrophages) and survival rate (percentage of intracellular bacteria at different times post-infection compared to the one at T0) of strain O157:H7 (EDL933) in contact with human macrophages (THP-1) at different times post-infection. B) Cytometry of EDL933 GFP in contact with human macrophages at T0 and T24 with percentage of total fluorescent cells and mean of fluorescence. C) Percentage of phagocytosis and survival rates of strain O157:H7 and isogenic mutant for *stx1* and *stx2* in contact with human macrophages (THP-1). The survival rate at T24 is lower for the two mutants compared to the wild-type ($P < 0.05$). D) Percentage of cytotoxicity of strain O157:H7 and isogenic mutant for *stx1* and *stx2* in contact with THP-1 measured by quantifying LDH release. The *stx1* mutant has cytotoxic level significantly lower than the wild-type of the *stx2* mutant. Percentage of cytotoxicity is expressed as $100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$. All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. Results are expressed as the mean \pm standard error of the replicate experiments and Student test is used for statistics.

Fig 2: Percentage of up and down-regulated genes for selected OI (OI containing more than 6 genes and showing a minimum of 15% of differentially expressed genes).

FIGURES

Figure 1

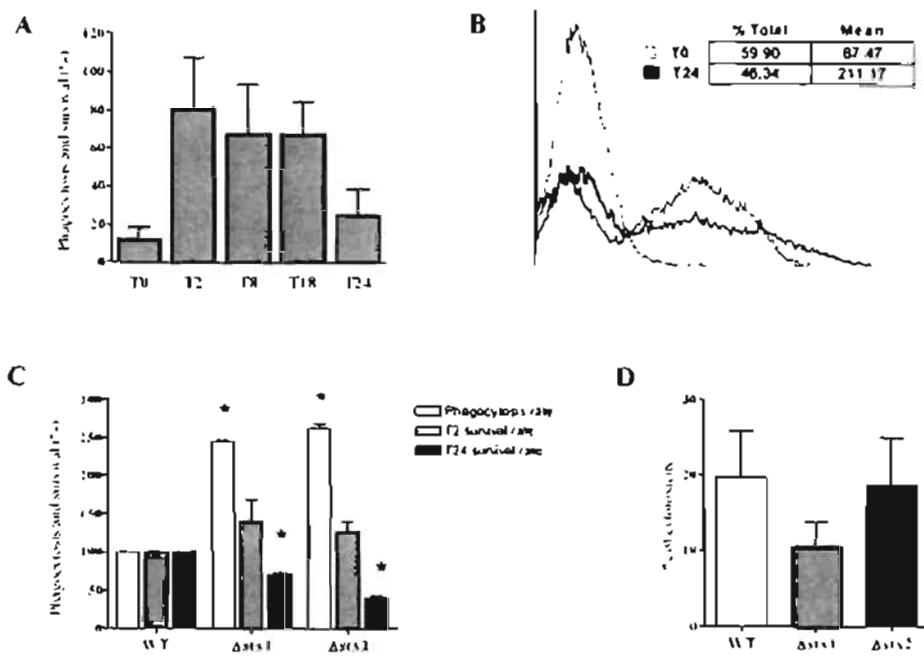
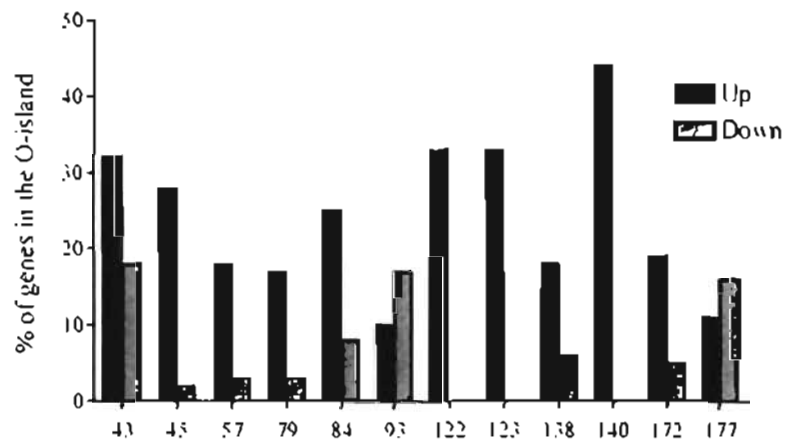


Figure 2



SUPPORTING INFORMATION : FIGURES LEGEND

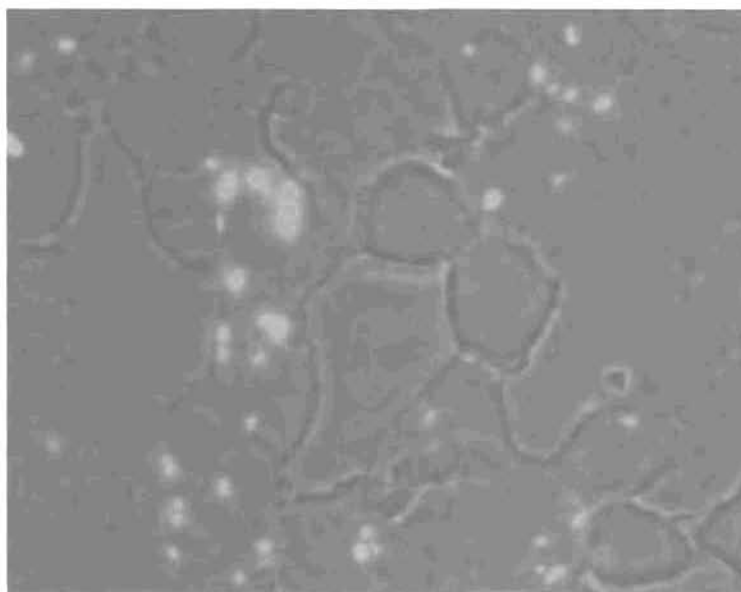
SI Fig 1: A) Fluorescence microscopy of infected macrophages with EDL933 GFP (DEF087) and human macrophages at T0. B) Fluorescence microscopy with EDL933 GFP and human macrophages at T24.

SI Fig 2: Global analysis of differentially expressed genes. A) Number of up or down-regulated genes at each intracellular time point of macrophage infection. B) Venn diagram of the number of up or down-regulated genes at each of the intracellular time point of macrophage infection. C) (COG) Percentage of up and down-regulated genes for each functional class.

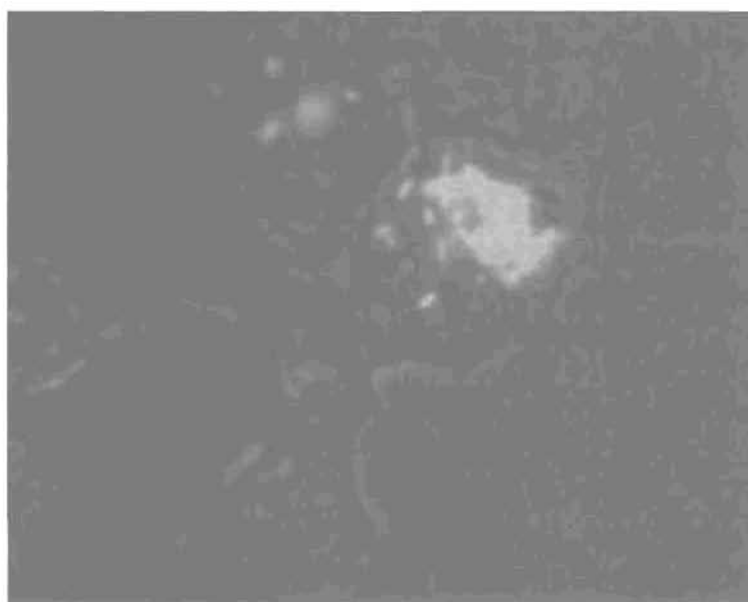
SI Fig 3: qPCR and microarray results for 6 genes. Fold variation for qPCR and microarray experiment at T24 compared to *in vitro* control (RPMI) and normalized to *gyrA* ($r = 0.9$).

Supporting information : Figure SI 1

A

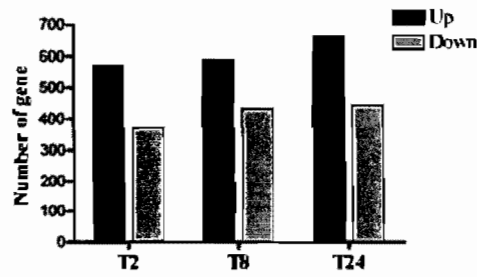


B

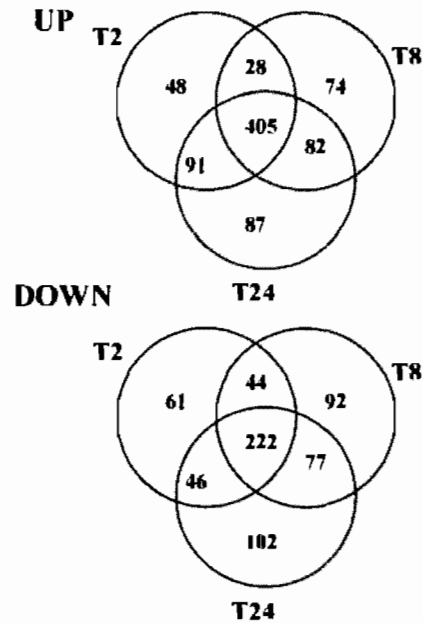


Supporting information : Figure SI 2

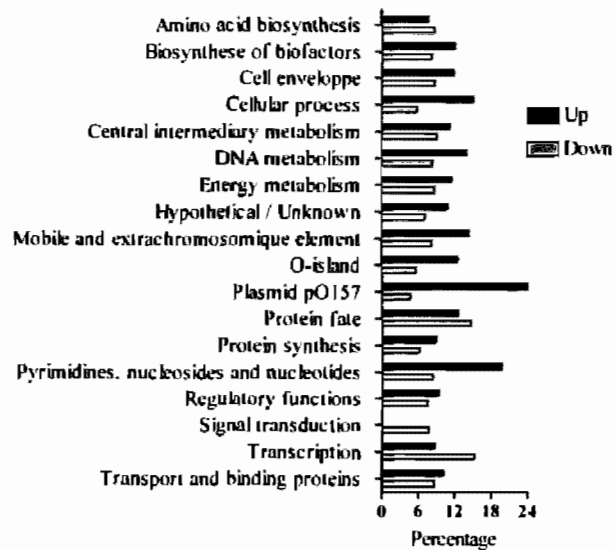
A



B



C



Supporting information : Figure SI 3

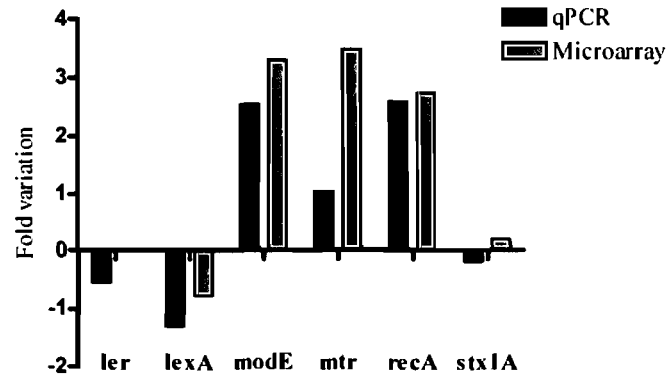


Table 1. List of primers

<u>SCOTS primers</u>	
RBI-RNA	CGGGATCCAGCTTCTCACGCANNNNNNNNN
RBI-PCR	CGGGATCCAGCTTCTCACGCA
<u>qPCR</u>	
gyrA-F	TAATGCTGTTCTCCGCCGAAGGTA
gyrA-R	TCGCCTAAACGAATACCGCGAACA
ler-F	TAATGTGCCTGATGATGGACTCGC
ler-R	ACAGTGCTTCTTTAAGCCAGCGTG
lexA-F	ATGACGAAGTTACCGTTAAGCGCC
lexA-R	TCAATGGTGAAGCTCTGCTGACGA
modE-F	AAACGCTGACAACCAATTACCGGG
modE-R	AAGTCGCTTCATTTACCGGCACTG
mtr-F	GGTCGTGTTCTCAAACCTTGCGGT
mtr-R	CGTCGAAACCAAACAGATCTGCCA
recA-F	GAATGCAACTGCCTGGCTGAAAGA
recA-R	ACAGAGAAATCCGGCGTTGAGTTC
stx1A-F	TAATGCAATTCTGGGAAGCGTGGC
stx1A-R	ATTGTGCGTAATCCCACGGACTCT

3.6 REFERENCES

1. **Abshire, K. Z., and F. C. Neidhardt.** 1993. Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophages. *J Bacteriol* **175**:3744-3748.
2. **Andrews, G. P., A. E. Hromockyj, C. Coker, and A. T. Maurelli.** 1991. Two novel virulence loci, *mxiA* and *mxiB*, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. *Infect Immun* **59**:1997-2005.
3. **Bagg, A., C. J. Kenyon, and G. C. Walker.** 1981. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:5749-5753.
4. **Baldassarri, L., L. Bertuccini, R. Creti, P. Filippini, M. G. Ammendolia, S. Koch, J. Huebner, and G. Orefici.** 2005. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages. *J Infect Dis* **191**:1253-1262.
5. **Baltes, N., F. F. Buettner, and G. F. Gerlach.** 2007. Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Vet Microbiol* **123**:110-121.
6. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
7. **Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41-64.
8. **Daigle, F., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd.** 2001. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**:1211-1222.
9. **Daigle, F., J. Y. Hou, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol* **358**:108-122.

10. **de Chastellier, C., and P. Berche.** 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect Immun* **62**:543-553.
11. **Elliott, E., Z. Li, C. Bell, D. Stiel, A. Buret, J. Wallace, I. Brzuszczyk, and E. O'Loughlin.** 1994. Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits. *Gastroenterology* **106**:1554-1561.
12. **Faucher, S. P., R. Curtiss, 3rd, and F. Daigle.** 2005. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect Immun* **73**:5217-5221.
13. **Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1906-1911.
14. **Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R. Woodgate.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**:1560-1572.
15. **Fittipaldi, N., M. Gottschalk, G. Vanier, F. Daigle, and J. Harel.** 2007. Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. *Appl Environ Microbiol* **73**:4359-4364.
16. **Foster, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* **2**:898-907.
17. **Froussard, P.** 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Res* **20**:2900.
18. **Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.** 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**:1167-1183.

19. **Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Pikis, M. Estay, and J. M. Keith.** 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **67**:2160-2165.
20. **Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin.** 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **178**:8168-8174.
21. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11554-11559.
22. **Graham, J. E., R. M. Peek, Jr., U. Krishna, and T. L. Cover.** 2002. Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterology* **123**:1637-1648.
23. **Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg.** 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **164**:3713-3722.
24. **Hagan, E. C., and H. L. Mobley.** 2007. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* **75**:3941-3949.
25. **Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, M. Bikowski, A. F. Peppercorn, M. Handfield, J. D. Hillman, F. Qadri, S. B. Calderwood, E. Hohmann, R. F. Breiman, W. A. Brooks, and E. T. Ryan.** 2006. Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**:5161-5168.
26. **Herold, S., J. Siebert, A. Huber, and H. Schmidt.** 2005. Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:931-944.
27. **Hou, J. Y., J. E. Graham, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by

- selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun* **70**:3714-3726.
28. **Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper.** 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. *J Clin Microbiol* **41**:4930-4940.
 29. **Khan, M. A., and R. E. Isaacson.** 2002. Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect Immun* **70**:3404-3412.
 30. **Li, G., C. Laturnus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**:2818-2827.
 31. **Louise, C. B., and T. G. Obrig.** 1991. Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* **59**:4173-4179.
 32. **Louise, C. B., and T. G. Obrig.** 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**:1397-1401.
 33. **Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J. C. Hinton, and J. Yu.** 2005. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* **73**:88-102.
 34. **Martinez-Argudo, I., C. Sands, and M. A. Jepson.** 2007. Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an *in vitro* M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol* **9**:1538-1546.
 35. **Medina, E., O. Goldmann, A. W. Toppel, and G. S. Chhatwal.** 2003. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* **187**:597-603.

36. **Miller, V. L., K. B. Beer, W. P. Loomis, J. A. Olson, and S. I. Miller.** 1992. An unusual pagC::TnphoA mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect Immun* **60**:3763-3770.
37. **Mills, M., and S. M. Payne.** 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **177**:3004-3009.
38. **Nazareth, H., S. A. Genagon, and T. A. Russo.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* survives within neutrophils. *Infect Immun* **75**:2776-2785.
39. **Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7800-7804.
40. **Ouyang, Z., and R. Isaacson.** 2006. Identification and Characterization of a Novel ABC Iron Transport System, *fit*, in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**:6949-6956.
41. **Paton, J. C., and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**:450-479.
42. **Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**:529-533.
43. **Phillips, A. D., and G. Frankel.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**:1496-1500.
44. **Pomposiello, P. J., M. H. Bennik, and B. Demple.** 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**:3890-3902.

45. **Ramegowda, B., and V. L. Tesh.** 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun* **64**:1173-1180.
46. **Shimada, O., H. Ishikawa, H. Tosaka-Shimada, and S. Atsumi.** 1999. Exocytotic secretion of toxins from macrophages infected with *Escherichia coli* O157. *Cell Struct Funct* **24**:247-253.
47. **Talaat, A. M., S. T. Howard, W. t. Hale, R. Lyons, H. Garner, and S. A. Johnston.** 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **30**:e104.
48. **Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-1407.
49. **Tatsuno, I., K. Nagano, K. Taguchi, L. Rong, H. Mori, and C. Sasakawa.** 2003. Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **71**:2598-2606.
50. **van de Kar, N. C., L. A. Monnens, M. A. Karmali, and V. W. van Hinsbergh.** 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* **80**:2755-2764.
51. **Voyich, J. M., K. R. Braughton, D. E. Sturdevant, C. Vuong, S. D. Kobayashi, S. F. Porcella, M. Otto, J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** 2004. Engagement of the pathogen survival response used by group A *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J Immunol* **173**:1194-1201.
52. **Voyich, J. M., D. E. Sturdevant, K. R. Braughton, S. D. Kobayashi, B. Lei, K. Virtaneva, D. W. Dorward, J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** 2003. Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1996-2001.

53. **Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N. F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B. Finlay.** 2006. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J Infect Dis* **194**:819-827.
54. **Wyckoff, E. E., D. Duncan, A. G. Torres, M. Mills, K. Maase, and S. M. Payne.** 1998. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **28**:1139-1152.

4. DISCUSSION

4.1 MISE EN CONTEXTE

Les infections humaines dues à *Escherichia coli* O157:H7 se chiffrent à plusieurs milliers chaque année. La bactérie emprunte le tractus gastro-intestinal pour s'établir dans l'intestin, grâce au LEE, où elle relâche les Shiga toxines. Ces toxines empruntent la voie sanguine afin de se lier à leur récepteur causant ainsi des maladies graves comme le SHU ou le PTT. Afin de se protéger contre les bactéries extracellulaires, l'hôte utilise son système immunitaire pour détruire ces microorganismes, généralement par phagocytose. À ce jour, aucune information n'est disponible sur l'interaction entre les macrophages humains et la bactérie *E. coli* O157:H7. Mon hypothèse de recherche était que *Escherichia coli* O157:H7 pouvait survivre à l'intérieur des macrophages humains permettant ainsi d'assurer sa survie et d'augmenter sa persistance dans l'organisme.

Les macrophages sont des outils puissants et efficaces lors de la lutte contre les infections bactériennes. Ils phagocytent les bactéries qui se retrouvent dans un compartiment intracellulaire évoluant rapidement en organelle bactéricide. La maturation du phagosome fait partie d'une séquence d'évènements qui implique la fusion avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes résultant en un compartiment inhospitalier nommé phagolysosome. Ce compartiment comprend du superoxyde, des hydrolases et possède un pH de 4,5 (94). Plusieurs microorganismes peuvent survivre et se multiplier dans les macrophages en modifiant le milieu phagosomal. La plupart des études concernant le milieu phagosomal sont effectuées avec des pathogènes modifiant ce milieu et la réelle composition de celui-ci est donc incertain. Par exemple, le pH est près de la neutralité dans la vacuole comprenant *Chlamydia trachomatis* ou *Salmonella* Typhimurium, bien que l'on sache que le pH atteint généralement 4,5 dans le phagolysosome typique (7, 90). Il existe plusieurs méthodes d'évasion de la séquence classique de modification du phagosome. Les microorganismes peuvent s'évader dans le cytoplasme (*Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* (81), arrêter la maturation à une étape pré-phagolysosome

(*Mycobacterium tuberculosis*) (263), ou rediriger la maturation du phagosome, par exemple pour ressembler à un compartiment du réticulum endoplasmique (*Brucella abortus*) (33). Le phagosome peut aussi être modifié suite à l'injection de protéines bactériennes dans le cytoplasme grâce à un SST3 et ainsi devenir un compartiment unique (*Salmonella*) (154).

Il est très difficile d'obtenir de l'information sur l'interaction d'une bactérie avec l'hôte humain, les expérimentations *in vivo* étant impossibles pour d'évidentes raisons éthiques. Ainsi, la culture de cellules humaines peut remplacer certaines expérimentations en devenant un modèle d'infection. Le contact entre les EHEC et les macrophages humains THP-1 mime une étape de l'infection. La souche séquencée de *E. coli* O157:H7 EDL933, une EHEC, ainsi que la lignée de macrophages humains THP-1 issue d'un lymphome humain ont été utilisées afin d'étudier l'interaction entre les bactéries et les macrophages. Différentes techniques ont été utilisées comme des infections, de mutants ou non, de la cytométrie en flux, de la microscopie électronique ou des biopuces. Dans cette expérience, les biopuces ont été utilisées afin d'étudier le profil transcriptionnel des bactéries dans les macrophages à divers temps intracellulaires soit 2 h, 8 h et 24 h. Ceux-ci sont comparés au profil transcriptionnel des bactéries dans le milieu de culture des macrophages humains en culture (RPMI). La modulation de l'expression des gènes, surexprimés ou réprimés, dans les différentes conditions testées est étudiée. L'expression d'un gène est considérée inchangée dans une condition précise lorsque son niveau de transcription est semblable dans la condition contrôle et dans cette condition précise. Les données des biopuces permettent d'avoir une vision globale de l'expression génique, mais aussi une vision plus spécifique. Effectivement, le niveau d'expression d'un gène en particulier peut être un indicateur de son implication dans l'infection. De cette façon, il est possible d'examiner l'activation génique globale tout en étudiant le profil transcriptionnel des gènes codant pour des facteurs de virulence déjà connus et vérifier leur participation à la survie dans les macrophages humains. Il est important de préciser que notre analyse s'est principalement concentrée sur le T24, car il y avait plus de gènes différentiellement transcrits pour ce temps intracellulaire. De plus, il correspond au temps intracellulaire où la multiplication bactérienne a été observée par

microscopie à fluorescence et que la majorité des gènes sont retrouvés à tous les temps intracellulaires testés (60%).

4.2 SURVIE ET MULTIPLICATION INTRACELLULAIRES

Les tests de survie de *E. coli* O157:H7 dans les macrophages humains THP-1 démontrent clairement que les bactéries survivent dans une bonne proportion (25%) après 24 h d'infection. Les EHEC sont reconnues comme étant des bactéries extracellulaires et certaines bactéries extracellulaires peuvent survivre dans les phagocytes comme *E. coli* (UPEC) (179), *Streptococcus* de groupe A (165, 268), *Staphylococcus aureus* (89) et *Enterococcus faecalis* (14, 77). La cytométrie en flux ainsi que la microscopie à fluorescence démontrent que *E. coli* O157:H7, en plus de survivre, se multiplie après 24 h d'infection. Les bactéries se regroupent au même endroit dans le macrophage laissant supposer qu'elles sont encore à l'intérieur des phagosomes. L'ampleur de la survie n'était pas attendue, mais la multiplication des bactéries dans les macrophages humains a été une véritable surprise. La capacité de se multiplier à l'intérieur des phagosomes est très impressionnante et jusqu'à maintenant, aucun facteur de virulence des EHEC n'était connu comme ayant un effet sur la survie dans les macrophages.

4.3 ADHÉSION ET RÉSISTANCE À L'ACIDITÉ

L'adhésion est une étape importante pour les bactéries pathogènes. Néanmoins, les structures médiant l'adhésion aux cellules comme les fimbriae et les adhésines ne sont pas différenciellement exprimées chez EDL933 infectant les macrophages humains. Le LEE est l'un des facteurs de virulence majeur des EHEC et EPEC. Il code pour un SST3 qui permet l'adhésion aux parois intestinales en injectant des protéines bactériennes directement dans le cytoplasme de la cellule de l'hôte. L'expression des gènes du LEE est globalement inchangée quoique l'expression de *espD* (*LEE4*), *tir* (*LEE5*) et *sepZ* (*LEE2*) soit réprimée au T24. Ces gènes codent pour des protéines s'insérant dans la membrane cellulaire de l'hôte ou des effecteurs. Chez *E. coli*

O157:H7, 5h après une adhésion médiée par le LEE aux érythrocytes de lapin, l'expression des gènes du LEE était aussi réprimée (41). Chez *Salmonella* Typhimurium et *Shigella flexneri*, des SST3 sont utilisés pour pénétrer dans les macrophages de l'hôte et leurs gènes sont réprimés une fois la bactérie à l'intérieur (58, 150). Il est donc possible que la répression des gènes des SST3 succède à une utilisation réussie pour l'adhésion ou l'invasion. Comme le milieu RPMI semble favoriser d'emblée l'expression des gènes du LEE le système SST3 est peut-être déjà en place lorsque les bactéries entrent en contact avec les macrophages humains. Il est possible que le LEE soit fonctionnel lors de l'interaction de EDL933 avec les macrophages humains. Le rôle du LEE dans la phagocytose des EPEC est connu, mais pas dans celle des EHEC. En effet, le LEE interagit avec les macrophages et diminue la phagocytose des EPEC, probablement via l'effecteur EspF (83, 202). Afin de déterminer l'implication du LEE dans la phagocytose, le taux de phagocytose de mutants pour l'intimine, Tir et certains effecteurs comme EspF, pourrait être déterminé.

La résistance à l'acidité est un facteur de virulence important chez *E. coli* O157:H7 et semble principalement utile lors du passage de la bactérie dans l'estomac de l'hôte. Par contre, il est connu que l'environnement des phagosomes de macrophages murins atteint un pH de 4,5 après quelques heures. Certaines espèces comme *Salmonella* se multiplient dans les phagosomes et ont développé la capacité d'augmenter le pH à environ 5,5 (7). Le pH est donc important pour la survie bactérienne à l'intérieur des phagosomes. Les deux systèmes de résistance à l'acidité extrême, AR2 et AR3 ainsi que trois régulateurs positifs de réponse à l'acidité, *gadE*, *adiY* et *yhiF* sont surexprimés par les bactéries 24 h post-infection des macrophages indiquant une possible acidification du phagosome. La transcription d'autres gènes de résistance à l'acidité est surexprimée tel que *hdeA* et *hdeD*, des chaperonnes impliquées dans le bon repliement des protéines dans un environnement acide (72, 160).

La bactérie invasive *Shigella flexneri* infecte les cellules épithéliales ainsi que les macrophages humains en survivant à l'intérieur du cytoplasme (215). La plupart des gènes requis pour l'infection de ces deux types de cellules sont semblables, mais une

étude comparant les deux profils transcriptomiques a identifié une dizaine de gènes spécifiquement exprimés lors de l'infection de macrophages humains U-937 (150). Cinq de ces gènes sont aussi surexprimés chez *E. coli* O157:H7 en contact avec les macrophages humains THP-1 soit *asr*, *gadB*, *hdeA*, *yhiE* et *yfdW* les quatre premiers participant à la réponse à l'acidité. La surexpression de certains gènes de résistance à l'acidité pour deux différentes espèces bactériennes présentes dans les macrophages humains témoigne de l'acidité de l'environnement, mais aussi l'importance de la résistance à l'acidité pour la survie bactérienne. De plus, un gène de virulence putatif tel que *yfdW*, exprimé très fortement dans les macrophages humains suite à une infection, non seulement par *Shigella flexneri*, mais aussi par *E. coli* O157:H7, est intéressant, car il pourrait coder pour une nouvelle protéine de résistance à l'acidité. Comme les gènes de résistance à l'acidité sont surexprimés, nous pouvons supposer que le phagosome s'acidifie et qu'il se modifie en phagolysosome. Dans ce cas, les étapes intermédiaires de fusion avec les endosomes ne seraient pas inhibées.

4.4 SHIGA TOXINES

Les Shiga toxines sont des facteurs de virulence très importants chez *E. coli* O157:H7. Les gènes *stx1* et *stx2* sont encodés par les prophages BP-933W (OI-45) et CP-933W (OI-93). À l'intérieur des macrophages humains, la transcription des sous-unités *stx1B* et *stx2B* est augmentée à T24, mais pas celle des sous-unités A. La non surexpression de *stx1A* est confirmée par qPCR. Le profil d'activation des gènes *stx1B* et *stx2B* est semblable. Le profil d'activation global des gènes du prophage BP-933W et CP-933W est différent. La transcription des gènes du prophage BP-933W est globalement augmentée, notamment les gènes de recombinaison et les gènes tardifs, parmi ceux-ci *stx2B*. Le promoteur des gènes tardifs permettrait la transcription des gènes des toxines, malgré la présence d'un autre promoteur spécifique à l'opéron *stx2AB* (269). Il est surprenant que le gène *stx2A* ne soit pas surexprimé, mais cette situation pourrait être expliquée par un deuxième promoteur spécifique à *stx2B* (81). Lorsqu'induit, ce prophage peut former des particules infectieuses et l'activation des gènes tardifs laisse croire à une possible relâche de particules virales (199).

Comparativement à la surexpression générale des gènes du prophage BP-933W, la transcription des gènes du prophage CP-933W est réprimée, principalement les gènes de réplication. L'expression des deux prophages n'est donc pas régulée de la même façon lorsque la bactérie est à l'intérieur des macrophages humains. Une grande différence dans le niveau d'activation des gènes des deux prophages avait également été remarquée chez EDL933 en présence de norfloxacine, un antibiotique inhibiteur de la réplication d'ADN (107). Par contre, il est important de noter que le gène *stx1B*, présent à l'intérieur du prophage CP-933W, est surexprimé. Ce gène est transcrit différemment des autres gènes du prophage, probablement par le promoteur spécifique de l'opéron *stx1AB* (269). Ce promoteur est activé dans un environnement faible en fer grâce au régulateur Fur. Par contre, la transcription du gène *fur* est réprimée dans les macrophages humains. Dans ce cas, l'activation du promoteur ne doit pas être dépendant de Fur. Aucun promoteur spécifique à *stx1B* n'a été identifié et la raison de la différence de quantité de transcrit avec *stx1A* est inconnue. Néanmoins, les Shiga toxines sont des toxines AB5 et pour former la toxine, cinq fois plus de sous-unités B sont nécessaires. Les différentes méthodes de régulation permettant d'atteindre le ratio de 5 :1 ne sont pas encore découvertes, mais la transcription différentielle pourrait en faire partie.

Puisque les gènes *stx* sont surexprimés, il est possible que les toxines participent à la survie et la réplication des EHEC dans les macrophages humains en entrant en contact avec la cellule hôte. Nous avons vérifié l'implication des Shiga toxines lors de l'infection de macrophages humains en utilisant des mutants Stx1 et Stx2. On peut supposer que les toxines sont produites à cause de la surexpression des sous-unités B des toxines. De plus, il a été prouvé que suite à l'infection de macrophages murins, les EHEC produisent les toxines Stx1 et Stx2 (227). Bien que les macrophages humains THP-1 possèdent le récepteur Gb3 à leur surface, il n'est pas certain que la membrane du phagosome expose les mêmes récepteurs permettant ainsi l'internalisation de la toxine. Il est clair que les toxines sont actives dans les macrophages, car nous avons démontré que le taux de phagocytose est augmenté et que le taux de survie à 24 h diminue pour les mutants pour Stx1 et Stx2. Par contre, nous ne savons pas comment les toxines entrent en contact avec le macrophage depuis l'intérieur. (141). Les Shiga

toxines auraient donc des propriétés antiphagocytaires, mais une fois à l'intérieur des macrophages, participeraient à augmenter la survie bactérienne. Les deux Shiga toxines n'ont pas le même impact sur la survie des bactéries dans les macrophages humains; Stx2 est plus impliquée dans la survie bactérienne que Stx1. Des tests de cytotoxicité ont aussi été effectués afin de déterminer l'effet des toxines sur la mort cellulaire des macrophages. Stx1 est plus cytotoxique que Stx2, qui l'est peu. Nos résultats montrent que la toxine interagit avec les macrophages humains au niveau de la mort cellulaire, ce qui avait déjà été observé (141). Nous pensons que les Shiga toxines sont exprimées par les EHEC tout au long de l'infection avec une augmentation vers 24 h.

Les toxines sont importantes pour la survie intracellulaire et interfèrent peut-être avec la multiplication des bactéries. Les deux toxines ont une influence différente sur la survie bactérienne et la mort cellulaire des macrophages humains, probablement causée par un arrêt de la synthèse protéique. Elles représentent des facteurs de virulence importants dont les fonctions pourraient être complémentaires. La détection et la quantification des deux Shiga toxines lors d'infection de macrophages humains seraient intéressantes. De plus, une complémentation des mutants permettraient de confirmer l'implication spécifique des toxines dans la survie. Cependant, une telle complémentation est difficile, car les gènes de la toxine ne possèdent plus le même environnement du prophage. L'impact sur la multiplication bactérienne à 24 h devrait être analysé grâce à de la microscopie à fluorescence, ou électronique, afin de déterminer si elle a toujours lieu pour les mutants Stx1 ou Stx2. Ces expérimentations supplémentaires permettraient de dresser un portrait plus fidèle de l'implication des Shiga toxines dans la survie ou encore dans la multiplication des macrophages.

4.5 PLASMIDE PO157 ET ÎLOTS O

Plusieurs gènes du plasmide pO157 sont surexprimés, comme *stcE* et le système *etp*, un SST2 sécrétant StcE. StcE est une zinc métalloprotéase qui possède aussi des propriétés immunomodulatrices induisant l'aggrégation des cellules T en culture (138). Le sérum des patients atteint du SHU réagit avec StcE démontrant ainsi sa production *in*

in vivo chez l'humain (192). La protéine pourrait agir directement sur les protéines du macrophage exprimées à l'intérieur du phagosome. Plusieurs autres gènes encore non caractérisés du plasmide pourraient aussi participer à augmenter la survie dans les macrophages humains et de plus amples recherches seront nécessaires pour déterminer leur implication.

E. coli O157:H7 possède 171 régions d'ADN uniques nommées îlots O. Sur les îlots O de plus de 15 kb, seulement la OI-43 (OI-48) et la OI-122 sont globalement surexprimées. La OI-43 code pour des gènes de résistance à la tellurite qui n'est pas un produit libre dans l'environnement. Par contre, des gènes de résistance contre ce produit sont présents chez plusieurs microorganismes pathogènes permettant d'émettre l'hypothèse selon laquelle les macrophages utiliseraient ce composé pour essayer d'éradiquer les bactéries présentes dans les phagosomes (250). Selon nous, il est probable que ce composé ou un autre semblable se retrouve parmi l'arsenal du macrophage humain, car certains gènes reliés à la résistance de ce produit sont surexprimés. Il est aussi possible que ces gènes possèdent une autre fonction encore non caractérisée. Parmi les gènes de virulence connus de l'OI-122 (124), *pagC* est le seul dont la transcription est augmentée et ce, à tous les temps intracellulaires. Sa fonction exacte est inconnue, mais PagC serait probablement une protéine de la membrane externe. Ce gène est présent chez *Salmonella* et est très important pour la survie dans les macrophages (168). Des études ont démontré que PagC de *Salmonella* Typhi était détectée *in vivo* chez l'humain et que la transcription du gène était surexprimée pendant l'infection *in vitro* de macrophages humains (61, 102). Bien que sa fonction demeure inconnue, nous pensons donc que PagC participe activement à la survie de *E. coli* O157:H7 dans les macrophages humains. Plusieurs gènes des îlots O ne sont pas encore caractérisés. Un nombre important de ces gènes étaient surexprimés dans les macrophages et pourraient être impliqués dans la survie ou la multiplication dans les macrophages humains.

4.6 L'APPROVISIONNEMENT EN FER

Le fer est un élément essentiel pour la croissance bactérienne. Le contenu exact en fer d'un phagosome n'est pas connu, mais sa disponibilité est diminuée par les protéines Nramp1 du macrophage qui captent les ions métalliques divalents du phagosome, incluant probablement le fer et particulièrement le manganèse (114). Chez *Salmonella* Typhi, les gènes de transport et d'acquisition du fer sont réprimés dans les macrophages humains (*feo*, *fhu*, *fes*, *ent*) indiquant ainsi qu'il y aurait présence de fer dans la vacuole (61). Cependant, il est connu que *Salmonella* modifie le phagosome pour créer un environnement particulier nommé la SCV pour «*Salmonella* containing vacuole ». Cette vacuole ressemble aux endosomes tardifs, la bactérie inhibant la fusion avec les lysosomes (166). Le compartiment dans lequel se trouve *E. coli* O157:H7 dans les macrophages est encore inconnu et il est possible que sa composition diffère de la SCV. L'expression génique des perméases *feoAB* et *zupT* est inchangée tandis que celle de *mntH* est augmentée à tous les temps intracellulaires. Chez *Salmonella* Typhimurium, la transcription de *mntH* est augmentée de 9 fois dès 2 heures après la phagocytose et ce, jusqu'à 24 h (277). Ce transporteur de métal analogue au Nramp des macrophages a une nette affinité pour le transport du manganèse, particulièrement dans un environnement acide comme dans le phagosome (126). Par contre, le fer peut aussi être capturé par l'entérobactine, le seul sidérophore de *E. coli* O157:H7. Les gènes *ent* semblent légèrement réprimés. À l'intérieur du macrophage humain, la transcription des gènes bactériens des systèmes de transport du fer dans sa forme libre n'est pas augmentée.

L'hème est une molécule de l'hôte séquestrant le fer et la bactérie peut utiliser cette molécule pour combler ses besoins en ions ferreux. Les gènes *chu* permettant l'utilisation d'hème, sont présents sur la OI-140 et leur transcription est fortement surexprimée. Il est important de souligner que ce système est présent chez plusieurs souches pathogènes comme les APEC, les UPEC, *Shigella flexneri* ainsi que *Yersinia pestis* (276) et est exprimé *in vivo* (97, 145, 232) (voir section 1.3.6.3). Un autre système de capture du fer moins connu, *fit*, présent sur la OI-125 est globalement surexprimé. Ce système est exprimé *in vivo* lors d'une infection de souris par une souche septicémique de *E. coli* O25:H⁻ (129). Nous pensons que ces systèmes sont importants *in vivo* et

participent à l'approvisionnement en fer de la bactérie à l'intérieur des macrophages humains.

Lorsque le fer est présent en grande quantité, l'organisme peut faire des réserves grâce à des molécules d'entreposage. Chez *E. coli*, il existe deux molécules majeures d'entreposage du fer, FtnA et Bfr. La transcription de ces gènes est augmentée en forte présence de fer (158). La répression de *ftnA* à tous les temps intracellulaires dans les macrophages humains était attendue, car cet environnement semble pauvre en fer. Cependant, *bfr* est surexprimé. La principale différence entre ferritine et bactérioferritine est que cette dernière est formée d'hèmes (8). Nous pensons donc que l'apport en hème dû à la surexpression des gènes *chu* augmente la formation de bactérioferritine qui entrepose l'hème. Ce gène pourrait être important dans la survie des EHEC dans les macrophages humains. Néanmoins, chez *Brucella melitensis*, un mutant Bfr survit très bien dans les macrophages humains. Cependant, *Brucella melitensis* modifie le phagosome afin de pouvoir s'y multiplier et il est probable que son environnement soit différent de celui des EHEC dans les macrophages humains (50, 209). Le taux de survie d'un mutant *bfr* pourrait être étudié afin de déterminer l'importance réelle de Bfr dans la survie des EHEC dans les macrophages humains. L'hypothèse selon laquelle l'apport en hème dû aux gènes *chu* augmente directement la transcription de *bfr* pourrait aussi être analysée. Le niveau de transcription du gène *bfr* dans la bactérie de type sauvage pourrait être comparé avec le niveau de transcription dans un mutant *chu* grâce à des fusions *lacZ*.

Un surplus de fer dans le cytoplasme est toxique et un antiport proton-dépendant, FieF, peut expulser le fer hors de la cellule s'il est présent en trop grandes quantités (88). Le gène *fieF* est surexprimé tout au long de l'expérience. La protéine de réserve Bfr est surexprimée, indiquant une activité de réserve d'hème, donc de fer. Un surplus de zinc intracellulaire peut aussi activer *fieF*, mais l'expression de l'antiport spécifique pour le zinc, *zitB*, reste inchangée (88) indiquant que l'apport en zinc n'est pas trop élevé. Nous pensons que la capacité d'entreposage de l'hème est moins rapide que sa capture, ce qui résulte en une quantité trop importante d'hèmes dans le cytoplasme augmentant ainsi la quantité de Fe^{2+} et activant l'antiport *fieF*.

5. CONCLUSION

Escherichia coli O157:H7 réussit à survivre et à se multiplier dans les macrophages humains THP-1. Nos études en cytométrie et la visualisation par microscopie à fluorescence permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle la multiplication s'effectue à l'intérieur des phagosomes. *E. coli* s'adapte à son nouveau milieu, survit et se multiplie dans les macrophages humains et ceci nécessite une orchestration coordonnée et l'expression de gènes spécifiques. Les biopuces ont fourni des données inestimables sur l'activation ou non de gènes spécifiques dans ce nouvel environnement, grâce à l'obtention du profil transcriptionnel global bactérien. Notre étude a permis d'impliquer plusieurs gènes de virulence connus lors de la survie dans les macrophages humains comme les gènes de résistance à l'acidité, les Shiga toxines, certains gènes de pO157 (*etp*, *stcE*), certains gènes des îlots O (*pagC*, *terA*, *terB*) ainsi que plusieurs gènes reliés au métabolisme du fer (*chu*, *fit*, *brf*, *fieF*). L'expression de ces gènes indique que la bactérie répondrait à un environnement acide, pauvre en fer, mais riche en hème. Il ne faut pas oublier qu'il y a aussi plusieurs gènes de fonction inconnue dont la transcription est augmentée dans les macrophages et qui peuvent participer activement à la survie, comme par exemple *yfdW*.

La technique de SCOTS offre plusieurs avantages indéniables (voir section 1.4.2). Par contre, l'amplification étant utilisée pour générer une plus grande quantité de matériel, des biais peuvent être introduits si celle-ci n'est pas linéaire. Néanmoins, il ne faut pas oublier que cette technique permet une détection sur la biopuce de plus de 70% des gènes permettant ainsi d'avoir une vision globale du profil transcriptomique. Cette caractéristique est excessivement importante et pertinente pour l'étude de pathogène humain. Je crois donc que les avantages de cette technique compensent largement ses possibles inconvénients.

Cette étude est très importante scientifiquement, car elle caractérise l'interaction de bactéries avec des macrophages humains censés les détruire. Cependant, l'action destructrice n'a pas complètement eu lieu, et certaines bactéries se sont plutôt

multipliées. Cette découverte est importante et soulève un nouvel aspect de la pathogénèse de *E. coli* O157:H7. En plus d'identifier des gènes potentiellement impliqués lors de cette survie intracellulaire, il a aussi été possible de constater l'implication des Shiga toxines dans la phagocytose et la survie des EHEC au contact avec les macrophages humains. Les deux toxines n'ont pas les mêmes impacts et il est possible que leur rôle dans la virulence diffère également. Il est évident que de plus amples recherches sont nécessaires afin de comprendre et analyser l'interaction complexe des macrophages humains et des bactéries *E. coli* O157:H7.

6. RÉFÉRENCES

1. **Abshire, K. Z., and F. C. Neidhardt.** 1993. Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophages. *J bacteriol* **175**:3744-3748.
2. **Acheson, D. W., A. V. Kane, and G. T. Keusch.** 2000. Shiga toxins. *Methods Mol Biol* **145**:41-63.
3. **Acheson, D. W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, and G. T. Keusch.** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* **64**:3294-3300.
4. **Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi, G. Douce, S. Knutton, and G. Dougan.** 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* **36**:662-668.
5. **Aizawa, S. I.** 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**:157-164.
6. **Akiba, M., T. Sameshima, and M. Nakazawa.** 2000. Clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected cattle. *FEMS Microbiol Lett* **184**:79-83.
7. **Alpuche Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller.** 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10079-10083.
8. **Andrews, S. C., N. E. Le Brun, V. Barynin, A. J. Thomson, G. R. Moore, J. R. Guest, and P. M. Harrison.** 1995. Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants. *J Biol Chem* **270**:23268-23274.
9. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-237.
10. **Angelichio, M. J., and A. Camilli.** 2002. *In vivo* expression technology. *Infect Immun* **70**:6518-6523.

11. **Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb Pathog* **34**:205-215.
12. **Badger, J. L., C. A. Wass, S. J. Weissman, and K. S. Kim.** 2000. Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**:5056-5061.
13. **Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockett, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Sonnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* **45**:1079-1093.
14. **Baldassarri, L., L. Bertuccini, R. Creti, P. Filippini, M. G. Ammendolia, S. Koch, J. Huebner, and G. Orefici.** 2005. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages. *J Infect Dis* **191**:1253-1262.
15. **Baltes, N., F. F. Buettner, and G. F. Gerlach.** 2007. Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Vet Microbiol* **123**:110-121.
16. **Bauer, M. E., and R. A. Welch.** 1996. Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* **64**:4665-4672.
17. **Bauer, M. E., and R. A. Welch.** 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**:167-175.
18. **Baumler, A. J., R. M. Tsois, and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**:1862-1865.
19. **Baumler, A. J., R. M. Tsois, and F. Heffron.** 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:279-283.

20. **Beltrametti, F., A. U. Kresse, and C. A. Guzman.** 1999. Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:3409-3418.
21. **Bian, Z., A. Brauner, Y. Li, and S. Normark.** 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* **181**:602-612.
22. **Bielaszewska, M., A. K. Sonntag, M. A. Schmidt, and H. Karch.** 2007. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes Infect* **9**:891-897.
23. **Boerlin, P.** 1999. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **56**:735-741.
24. **Boerlin, P., S. Chen, J. K. Colbourne, R. Johnson, S. De Grandis, and C. Gyles.** 1998. Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect Immun* **66**:2553-2561.
25. **Brunder, W., H. Schmidt, M. Frosch, and H. Karch.** 1999. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* **145** (Pt 5):1005-1014.
26. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* **24**:767-778.
27. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **142** (Pt 11):3305-3315.
28. **Bullen, J. J., H. J. Rogers, and E. Griffiths.** 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **80**:1-35.
29. **Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner.** 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* **26**:4196-4204.

30. **Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**:664-678.
31. **Calderwood, S. B., and J. J. Mekalanos.** 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J Bacteriol* **169**:4759-4764.
32. **Capitani, G., D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, and M. G. Grutter.** 2003. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *EMBO J* **22**:4027-4037.
33. **Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, and J. P. Gorvel.** 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**:545-556.
34. **Celli, J., M. Olivier, and B. B. Finlay.** 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J* **20**:1245-1258.
35. **Cheng, S., C. J. Clancy, M. A. Checkley, M. Handfield, J. D. Hillman, A. Progulsk-Fox, A. S. Lewin, P. L. Fidel, and M. H. Nguyen.** 2003. Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol Microbiol* **48**:1275-1288.
36. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **66**:724-731.
37. **Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Donnenberg, G. Frankel, and S. Knutton.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **150**:527-538.
38. **Cookson, A. L., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2002. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* **292**:195-205.

39. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
40. **Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41-64.
41. **Dahan, S., S. Knutton, R. K. Shaw, V. F. Crepin, G. Dougan, and G. Frankel.** 2004. Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect Immun* **72**:5452-5459.
42. **Daigle, F., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd.** 2001. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**:1211-1222.
43. **Daigle, F., J. Y. Hou, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol* **358**:108-122.
44. **Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy, and G. Frankel.** 2003. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:301-308.
45. **Day, N. P., S. M. Scotland, T. Cheasty, and B. Rowe.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. *Lancet* **1**:825.
46. **de Chastellier, C., and P. Berche.** 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect Immun* **62**:543-553.
47. **Dean, P., and B. Kenny.** 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol Microbiol* **54**:665-675.
48. **Deb, D. K., P. Dahiya, K. K. Srivastava, R. Srivastava, and B. S. Srivastava.** 2002. Selective identification of new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach. *Tuberculosis (Edinb)* **82**:175-182.
49. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D.**

- Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3597-3602.
50. **Denoel, P. A., R. M. Crawford, M. S. Zygmunt, A. Tibor, V. E. Weynants, F. Godfroid, D. L. Hoover, and J. J. Letesson.** 1997. Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **65**:4337-4340.
51. **DeVinney, R., J. L. Puente, A. Gauthier, D. Goosney, and B. B. Finlay.** 2001. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* **41**:1445-1458.
52. **Devireddy, L. R., J. G. Teodoro, F. A. Richard, and M. R. Green.** 2001. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* **293**:829-834.
53. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-252.
54. **Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **150**:3631-3645.
55. **Elliott, E. J., and R. M. Robins-Browne.** 2005. Hemolytic uremic syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **35**:310-330.
56. **Elliott, E. J., R. M. Robins-Browne, E. V. O'Loughlin, V. Bennett-Wood, J. Bourke, P. Henning, G. G. Hogg, J. Knight, H. Powell, and D. Redmond.** 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* **85**:125-131.
57. **Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper.** 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**:6115-6126.

58. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**:103-118.
59. **Farr, S. B., and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**:561-585.
60. **Faucher, S. P., R. Curtiss, 3rd, and F. Daigle.** 2005. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect Immun* **73**:5217-5221.
61. **Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1906-1911.
62. **Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R. Woodgate.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**:1560-1572.
63. **Fischbach, M. A., H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem, and K. D. Smith.** 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16502-16507.
64. **Fittipaldi, N., M. Gottschalk, G. Vanier, F. Daigle, and J. Harel.** 2007. Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. *Appl Environ Microbiol* **73**:4359-4364.
65. **Fitzhenry, R., S. Dahan, A. G. Torres, Y. Chong, R. Heuschkel, S. H. Murch, M. Thomson, J. B. Kaper, G. Frankel, and A. D. Phillips.** 2006. Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect* **8**:1741-1749.
66. **Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, E. L. Hartland, S. Reece, G. Dougan, A. D. Phillips, and G. Frankel.** 2002. Intimin type influences the site of human

- intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Gut **50**:180-185.
67. **Foster, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat Rev Microbiol **2**:898-907.
 68. **Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch.** 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis **185**:74-84.
 69. **Froussard, P.** 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. Nucleic Acids Res **20**:2900.
 70. **Fuller, T. E., R. J. Shea, B. J. Thacker, and M. H. Mulks.** 1999. Identification of *in vivo* induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb Pathog **27**:311-327.
 71. **Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard, and M. A. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. Mol Microbiol **44**:1225-1234.
 72. **Gajiwala, K. S., and S. K. Burley.** 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. J Mol Biol **295**:605-612.
 73. **Garcia, A., R. P. Marini, Y. Feng, A. Vitsky, K. A. Knox, N. S. Taylor, D. B. Schauer, and J. G. Fox.** 2002. A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced disease. J Infect Dis **186**:1682-1686.
 74. **Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.** 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. Cell Microbiol **6**:1167-1183.
 75. **Garmendia, J., Z. Ren, S. Tennant, M. A. Midolli Viera, Y. Chong, A. Whale, K. Azzopardi, S. Dahan, M. P. Sircili, M. R. Franzolin, L. R. Trabulsi, A. Phillips, T. A. Gomes, J. Xu, R. Robins-Browne, and G. Frankel.** 2005. Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol **43**:5715-5720.

76. **Garrido, P., M. Blanco, M. Moreno-Paz, C. Briones, G. Dahbi, J. Blanco, and V. Parro.** 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem* **52**:192-201.
77. **Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Pikis, M. Estay, and J. M. Keith.** 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **67**:2160-2165.
78. **Gerstel, U., and U. Romling.** 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**:638-648.
79. **Girard, F., I. Batisson, G. M. Frankel, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2005. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infect Immun* **73**:6005-6016.
80. **Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin.** 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **178**:8168-8174.
81. **Goetz, M., A. Bubert, G. Wang, I. Chico-Calero, J. A. Vazquez-Boland, M. Beck, J. Slaghuis, A. A. Szalay, and W. Goebel.** 2001. Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12221-12226.
82. **Gomez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper.** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:1767-1776.
83. **Goosney, D. L., J. Celli, B. Kenny, and B. B. Finlay.** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun* **67**:490-495.
84. **Gorden, J., and P. L. Small.** 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* **61**:364-367.

85. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11554-11559.
86. **Graham, J. E., R. M. Peek, Jr., U. Krishna, and T. L. Cover.** 2002. Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterology* **123**:1637-1648.
87. **Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire, and C. Rensing.** 2005. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**:1604-1611.
88. **Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies, and D. Munkelt.** 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**:9-18.
89. **Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg.** 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* **164**:3713-3722.
90. **Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, and T. Hackstadt.** 2003. *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci* **116**:3793-3802.
91. **Griffin, P. M., and R. V. Tauxe.** 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**:60-98.
92. **Grys, T. E., M. B. Siegel, W. W. Lathem, and R. A. Welch.** 2005. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* **73**:1295-1303.
93. **Grys, T. E., L. L. Walters, and R. A. Welch.** 2006. Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **188**:4646-4653.
94. **Haas, A.** 2007. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**:311-330.

95. **Habib, N. F., and M. P. Jackson.** 1992. Identification of a B subunit gene promoter in the Shiga toxin operon of *Shigella dysenteriae* 1. *J Bacteriol* **174**:6498-6507.
96. **Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel.** 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* **8**:213-225.
97. **Hagan, E. C., and H. L. Mobley.** 2007. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* **75**:3941-3949.
98. **Halliwell, B., and J. M. Gutteridge.** 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* **307**:108-112.
99. **Hamelin, K., G. Bruant, A. El-Shaarawi, S. Hill, T. A. Edge, J. Fairbrother, J. Harel, C. Maynard, L. Masson, and R. Brousseau.** 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl Environ Microbiol* **73**:477-484.
100. **Handfield, M., L. J. Brady, A. Progulske-Fox, and J. D. Hillman.** 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol* **8**:336-339.
101. **Hantke, K.** 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**:288-292.
102. **Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, M. Bikowski, A. F. Peppercorn, M. Handfield, J. D. Hillman, F. Qadri, S. B. Calderwood, E. Hohmann, R. F. Breiman, W. A. Brooks, and E. T. Ryan.** 2006. Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**:5161-5168.
103. **Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa.** 2001. Complete genome

- sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**:11-22.
104. **Haydel, S. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 2004. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **236**:341-347.
 105. **Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel, and M. J. Mahan.** 1997. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:934-939.
 106. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-403.
 107. **Herold, S., J. Siebert, A. Huber, and H. Schmidt.** 2005. Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:931-944.
 108. **Hinton, J. C., I. Hautefort, S. Eriksson, A. Thompson, and M. Rhen.** 2004. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol* **7**:277-282.
 109. **Hou, J. Y., J. E. Graham, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun* **70**:3714-3726.
 110. **Hudson, A. J., S. C. Andrews, C. Hawkins, J. M. Williams, M. Izuhara, F. C. Meldrum, S. Mann, P. M. Harrison, and J. R. Guest.** 1993. Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *Eur J Biochem* **218**:985-995.
 111. **Iyoda, S., N. Koizumi, H. Satou, Y. Lu, T. Saitoh, M. Ohnishi, and H. Watanabe.** 2006. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:5682-5692.

112. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrIR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:4086-4094.
113. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357-2571.
114. **Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros.** 2000. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* **192**:1237-1248.
115. **Jackson, M. P., J. W. Newland, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **2**:147-153.
116. **Janka, A., G. Becker, A. K. Sonntag, M. Bielaszewska, U. Dobrindt, and H. Karch.** 2005. Presence and characterization of a mosaic genomic island which distinguishes sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- from *E. coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **71**:4875-4878.
117. **Jerse, A. E., and J. B. Kaper.** 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* **59**:4302-4309.
118. **Jin, Q., Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, and J. Yu.** 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**:4432-4441.
119. **John, M., I. T. Kudva, R. W. Griffin, A. W. Dodson, B. McManus, B. Krastins, D. Sarracino, A. Progulske-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield, P. I.**

- Tarr, and S. B. Calderwood.** 2005. Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infect Immun* **73**:2665-2679.
120. **Jordan, D. M., N. Cornick, A. G. Torres, E. A. Dean-Nystrom, J. B. Kaper, and H. W. Moon.** 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo*. *Infect Immun* **72**:6168-6171.
121. **Jurado, R. L.** 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* **25**:888-895.
122. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6212-6219.
123. **Karch, H., H. Russmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and J. Heesemann.** 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol* **33**:1602-1605.
124. **Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper.** 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. *J Clin Microbiol* **41**:4930-4940.
125. **Kashiwagi, K., and K. Igarashi.** 1987. Nonspecific inhibition of *Escherichia coli* ornithine decarboxylase by various ribosomal proteins: detection of a new ribosomal protein possessing strong antizyme activity. *Biochim Biophys Acta* **911**:180-190.
126. **Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* **36**:1085-1100.
127. **Kenny, B.** 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int J Med Microbiol* **291**:469-477.
128. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.

129. **Khan, M. A., and R. E. Isaacson.** 2002. Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect Immun* **70**:3404-3412.
130. **Kim, S. H., and Y. H. Kim.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7 adherence to HEp-2 cells is implicated with curli expression and outer membrane integrity. *J Vet Sci* **5**:119-124.
131. **Kolling, G. L., and K. R. Matthews.** 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**:1843-1848.
132. **Kozlov Yu, V., A. A. Kabishev, E. V. Lukyanov, and A. A. Bayev.** 1988. The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin. *Gene* **67**:213-221.
133. **Kresse, A. U., I. Rienacker, A. M. Valle, H. Steinruck, H. Claus, S. M. Payne, H. Tschape, P. H. Williams, and R. Reissbrodt.** 2007. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 serovars differ in their mechanisms for iron supply. *Int J Med Microbiol* **297**:9-15.
134. **Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-605.
135. **Lai, Y. C., H. L. Peng, and H. Y. Chang.** 2001. Identification of genes induced *in vivo* during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. *Infect Immun* **69**:7140-7145.
136. **Langermann, S., S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig, S. Leath, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**:607-611.
137. **Lathem, W. W., T. Bergsbaken, S. E. Witowski, N. T. Perna, and R. A. Welch.** 2003. Acquisition of *stcE*, a C1 esterase inhibitor-specific metalloprotease, during the evolution of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* **187**:1907-1914.

138. **Lathem, W. W., T. E. Grys, S. E. Witowski, A. G. Torres, J. B. Kaper, P. I. Tarr, and R. A. Welch.** 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* **45**:277-288.
139. **Law, D., and J. Kelly.** 1995. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect Immun* **63**:700-702.
140. **LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne, and T. A. Cebula.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**:1208-1211.
141. **Lee, S. Y., R. P. Cherla, and V. L. Tesh.** 2007. Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1. *Infect Immun* **75**:1291-1302.
142. **Leveille, S., M. Caza, J. R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri, and C. M. Dozois.** 2006. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catechololate siderophore receptor. *Infect Immun* **74**:3427-3436.
143. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-389.
144. **Li, B., W. H. Koch, and T. A. Cebula.** 1997. Detection and characterization of the *fimA* gene of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Cell Probes* **11**:397-406.
145. **Li, G., C. LTURNUS, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**:2818-2827.
146. **Litwin, C. M., and S. B. Calderwood.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**:137-149.
147. **Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, 2nd, and B. J. Wilkinson.** 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* **68**:1697-1705.

148. **Low, A. S., F. Dziva, A. G. Torres, J. L. Martinez, T. Rosser, S. Naylor, K. Spears, N. Holden, A. Mahajan, J. Findlay, J. Sales, D. G. Smith, J. C. Low, M. P. Stevens, and D. L. Gally.** 2006. Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **74**:2233-2244.
149. **Low, A. S., N. Holden, T. Rosser, A. J. Roe, C. Constantinidou, J. L. Hobman, D. G. Smith, J. C. Low, and D. L. Gally.** 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **8**:1033-1047.
150. **Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J. C. Hinton, and J. Yu.** 2005. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* **73**:88-102.
151. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos.** 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**:686-688.
152. **Maki, D. G.** 2006. Don't eat the spinach--controlling foodborne infectious disease. *N Engl J Med* **355**:1952-1955.
153. **Makino, K., K. Ishii, T. Yasunaga, M. Hattori, K. Yokoyama, C. H. Yutsudo, Y. Kubota, Y. Yamaichi, T. Iida, K. Yamamoto, T. Honda, C. G. Han, E. Ohtsubo, M. Kasamatsu, T. Hayashi, S. Kuhara, and H. Shinagawa.** 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* **5**:1-9.
154. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* **35**:1065-1078.
155. **Malone, A. S., Y. K. Chung, and A. E. Yousef.** 2006. Genes of *Escherichia coli* O157:H7 that are involved in high-pressure resistance. *Appl Environ Microbiol* **72**:2661-2671.

156. **Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan, and V. M. Unger.** 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**:1040-1042.
157. **Martinez-Argudo, I., C. Sands, and M. A. Jepson.** 2007. Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an *in vitro* M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol* **9**:1538-1546.
158. **Masse, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-4625.
159. **Masse, E., C. K. Vanderpool, and S. Gottesman.** 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:6962-6971.
160. **Masuda, N., and G. M. Church.** 2003. Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:699-712.
161. **Maurelli, A. T., P. R. Routh, R. C. Dillman, M. D. Ficken, D. M. Weinstock, G. W. Almond, and P. E. Orndorff.** 1998. *Shigella* infection as observed in the experimentally inoculated domestic pig, *Sus scrofa domestica*. *Microb Pathog* **25**:189-196.
162. **McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1664-1668.
163. **McGraw, E. A., J. Li, R. K. Selander, and T. S. Whittam.** 1999. Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, and gamma intimins of pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **16**:12-22.
164. **Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5**:607-625.
165. **Medina, E., O. Goldmann, A. W. Toppel, and G. S. Chhatwal.** 2003. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* **187**:597-603.

166. **Meresse, S., O. Steele-Mortimer, B. B. Finlay, and J. P. Gorvel.** 1999. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* **18**:4394-4403.
167. **Mietzner, T. A., and S. A. Morse.** 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu Rev Nutr* **14**:471-493.
168. **Miller, V. L., K. B. Beer, W. P. Loomis, J. A. Olson, and S. I. Miller.** 1992. An unusual pagC::TnpA mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect Immun* **60**:3763-3770.
169. **Mills, M., and S. M. Payne.** 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **177**:3004-3009.
170. **Moake, J. L.** 1994. Haemolytic-uraemic syndrome: basic science. *Lancet* **343**:393-397.
171. **Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**:1340-1351.
172. **Morabito, S., R. Tozzoli, E. Oswald, and A. Caprioli.** 2003. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect Immun* **71**:3343-3348.
173. **Morrow, B. J., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd.** 1999. Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome. *Infect Immun* **67**:5106-5116.
174. **Motley, S. T., B. J. Morrow, X. Liu, I. L. Dodge, A. Vitiello, C. K. Ward, and K. J. Shaw.** 2004. Simultaneous analysis of host and pathogen interactions during an *in vivo* infection reveals local induction of host acute phase response proteins, a novel bacterial stress response, and evidence of a host-imposed metal ion limited environment. *Cell Microbiol* **6**:849-865.

175. **Moxon, R., and C. Tang.** 2000. Challenge of investigating biologically relevant functions of virulence factors in bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**:643-656.
176. **Mukhopadhyay, P., M. Zheng, L. A. Bedzyk, R. A. LaRossa, and G. Storz.** 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:745-750.
177. **Mundy, R., S. Schuller, F. Girard, J. M. Fairbrother, A. D. Phillips, and G. Frankel.** 2007. Functional studies of intimin *in vivo* and *ex vivo*: implications for host specificity and tissue tropism. *Microbiology* **153**:959-967.
178. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
179. **Nazareth, H., S. A. Genagon, and T. A. Russo.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* survives within neutrophils. *Infect Immun* **75**:2776-2785.
180. **Nealson, K. H., and A. Markovitz.** 1970. Mutant analysis and enzyme subunit complementation in bacterial bioluminescence in *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **104**:300-312.
181. **Neely, M. N., and D. I. Friedman.** 2003. Analyzing transcription antitermination in lambdoid phages encoding toxin genes. *Methods Enzymol* **371**:418-438.
182. **Newton, H. J., J. Sloan, V. Bennett-Wood, L. M. Adams, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2004. Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:1230-1239.
183. **Nicholls, L., T. H. Grant, and R. M. Robins-Browne.** 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**:275-288.

184. **O'Brien, A. D., T. A. Lively, T. W. Chang, and S. L. Gorbach.** 1983. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* **2**:573.
185. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**:65-94.
186. **O'Flynn, G., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and A. Coffey.** 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **70**:3417-3424.
187. **Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7800-7804.
188. **Old, D. C., P. B. Crichton, A. J. Maunder, and M. I. Wilson.** 1980. Discrimination of urinary strains of *Escherichia coli* by five typing methods. *J Med Microbiol* **13**:437-444.
189. **Ostroff, S. M., P. I. Tarr, M. A. Neill, J. H. Lewis, N. Hargrett-Bean, and J. M. Kobayashi.** 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* **160**:994-998.
190. **Ouyang, Z., and R. Isaacson.** 2006. Identification and characterization of a novel ABC iron transport system, fit, in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**:6949-6956.
191. **Panos, G. Z., G. I. Betsi, and M. E. Falagas.** 2006. Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment Pharmacol Ther* **24**:731-742.
192. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 2002. Reactivity of convalescent-phase hemolytic-uremic syndrome patient sera with the megaplasmid-encoded TagA protein of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157. *J Clin Microbiol* **40**:1395-1399.

193. **Paton, J. C., and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**:450-479.
194. **Pawar, D. M., M. L. Rossman, and J. Chen.** 2005. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* **99**:418-425.
195. **Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**:529-533.
196. **Phillips, A. D., and G. Frankel.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**:1496-1500.
197. **Pierard, D., N. Crowcroft, S. De Bock, D. Potters, G. Crabbe, F. Van Loock, and S. Lauwers.** 1999. A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect* **122**:359-365.
198. **Pierard, D., L. Huyghens, S. Lauwers, and H. Lior.** 1991. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* **338**:762.
199. **Plunkett, G., 3rd, D. J. Rose, T. J. Durfee, and F. R. Blattner.** 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* **181**:1767-1778.
200. **Pomposiello, P. J., M. H. Bennik, and B. Demple.** 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**:3890-3902.
201. **Pouttu, R., B. Westerlund-Wikstrom, H. Lang, K. Alsti, R. Virkola, U. Saarela, A. Siitonen, N. Kalkkinen, and T. K. Korhonen.** 2001. *matB*, a

- common fimbrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J Bacteriol* **183**:4727-4736.
202. **Quitard, S., P. Dean, M. Maresca, and B. Kenny.** 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell Microbiol* **8**:972-981.
203. **Rashid, R. A., P. I. Tarr, and S. L. Moseley.** 2006. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microb Pathog* **41**:207-217.
204. **Raymond, K. N., E. A. Dertz, and S. S. Kim.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3584-3588.
205. **Rediers, H., P. B. Rainey, J. Vanderleyden, and R. De Mot.** 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of *in vivo* expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:217-261.
206. **Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam.** 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**:64-67.
207. **Rendon, M. A., Z. Saldana, A. L. Erdem, V. Monteiro-Neto, A. Vazquez, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron.** 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10637-10642.
208. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**:681-685.
209. **Rittig, M. G., M. T. Alvarez-Martinez, F. Porte, J. P. Liautard, and B. Rouot.** 2001. Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* **69**:3995-4006.

210. **Robinson, C. M., J. F. Sinclair, M. J. Smith, and A. D. O'Brien.** 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:9667-9672.
211. **Roe, A. J., L. Tysall, T. Dransfield, D. Wang, D. Fraser-Pitt, A. Mahajan, C. Constandinou, N. Inglis, A. Downing, R. Talbot, D. G. Smith, and D. L. Gally.** 2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* **153**:1350-1360.
212. **Rollins, S. M., A. Peppercorn, L. Hang, J. D. Hillman, S. B. Calderwood, M. Handfield, and E. T. Ryan.** 2005. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cell Microbiol* **7**:1-9.
213. **Russel, M.** 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* **279**:485-499.
214. **Sandvig, K., K. Prydz, M. Ryd, and B. van Deurs.** 1991. Endocytosis and intracellular transport of the glycolipid-binding ligand Shiga toxin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **113**:553-562.
215. **Sansonetti, P.** 2002. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**:III2-8.
216. **Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**:1055-1061.
217. **Schmidt, H., C. Geitz, P. I. Tarr, M. Frosch, and H. Karch.** 1999. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* **179**:115-123.
218. **Schmidt, H., B. Henkel, and H. Karch.** 1997. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* **148**:265-272.
219. **Schmidt, H., H. Karch, and L. Beutin.** 1994. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are

- presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. FEMS Microbiol Lett **117**:189-196.
220. **Schmittgen, T. D.** 2001. Real-time quantitative PCR. Methods **25**:383-385.
221. **Schuller, S., G. Frankel, and A. D. Phillips.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. Cell Microbiol **6**:289-301.
222. **Sharma, V. K., and R. L. Zuerner.** 2004. Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol **186**:7290-7301.
223. **Shaw, R. K., K. Smollett, J. Cleary, J. Garmendia, A. Straatman-Iwanowska, G. Frankel, and S. Knutton.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. Infect Immun **73**:4385-4390.
224. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:2593-2597.
225. **Shen, S., M. Mascarenhas, K. Rahn, J. B. Kaper, and M. A. Karmali.** 2004. Evidence for a hybrid genomic island in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* CL3 (serotype O113:H21) containing segments of EDL933 (serotype O157:H7) O islands 122 and 48. Infect Immun **72**:1496-1503.
226. **Shepley, D. P., and J. W. Little.** 1996. Mutant LexA proteins with specific defects in autodigestion. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:11528-11533.
227. **Shimada, O., H. Ishikawa, H. Tosaka-Shimada, and S. Atsumi.** 1999. Exocytotic secretion of toxins from macrophages infected with *Escherichia coli* O157. Cell Struct Funct **24**:247-253.
228. **Shimizu, T., S. Yamasaki, T. Tsukamoto, and Y. Takeda.** 1999. Analysis of the genes responsible for the O-antigen synthesis in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. Microb Pathog **26**:235-247.
229. **Sinclair, J. F., and A. D. O'Brien.** 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem **277**:2876-2885.

230. **Sinclair, J. F., and A. D. O'Brien.** 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J Biol Chem* **279**:33751-33758.
231. **Sjogren, R., R. Neill, D. Rachmilewitz, D. Fritz, J. Newland, D. Sharpnack, C. Colleton, J. Fondacaro, P. Gemski, and E. Boedeker.** 1994. Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology* **106**:306-317.
232. **Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, M. S. Sonnenberg, R. A. Welch, and H. L. Mobley.** 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**:6373-6381.
233. **Song, Y. H., E. V. Kozarov, S. M. Walters, S. L. Cao, M. Handfield, J. D. Hillman, and A. Progulsk-Fox.** 2002. Genes of periodontopathogens expressed during human disease. *Ann Periodontol* **7**:38-42.
234. **Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper.** 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15196-15201.
235. **Stevens, M. P., A. J. Roe, I. Vlisidou, P. M. van Diemen, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, D. L. Gally, and T. S. Wallis.** 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun* **72**:5402-5411.
236. **Stevens, M. P., P. M. van Diemen, F. Dziva, P. W. Jones, and T. S. Wallis.** 2002. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. *Microbiology* **148**:3767-3778.
237. **Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips, and T. S. Wallis.** 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**:5158-5166.

238. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**:135-140.
239. **Stumpfle, P., H. Broll, and L. Beutin.** 1999. Absence of DNA sequence homology with genes of the *Escherichia coli hemB* locus in Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* **174**:97-103.
240. **Suits, M. D., G. P. Pal, K. Nakatsu, A. Matte, M. Cygler, and Z. Jia.** 2005. Identification of an *Escherichia coli* O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16955-16960.
241. **Sung, L. M., M. P. Jackson, A. D. O'Brien, and R. K. Holmes.** 1990. Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**:6386-6395.
242. **Talaat, A. M., S. T. Howard, W. t. Hale, R. Lyons, H. Garner, and S. A. Johnston.** 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **30**:e104.
243. **Tamano, K., S. Aizawa, and C. Sasakawa.** 2002. Purification and detection of *Shigella* type III secretion needle complex. *Methods Enzymol* **358**:385-392.
244. **Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-1407.
245. **Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi, and C. Sasakawa.** 2001. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**:6660-6669.
246. **Tatsuno, I., H. Kimura, A. Okutani, K. Kanamaru, H. Abe, S. Nagai, K. Makino, H. Shinagawa, M. Yoshida, K. Sato, J. Nakamoto, T. Tobe, and C. Sasakawa.** 2000. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. *Infect Immun* **68**:5943-5952.

247. **Tatsuno, I., R. Mundy, G. Frankel, Y. Chong, A. D. Phillips, A. G. Torres, and J. B. Kaper.** 2006. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **74**:265-272.
248. **Tatsuno, I., K. Nagano, K. Taguchi, L. Rong, H. Mori, and C. Sasakawa.** 2003. Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **71**:2598-2606.
249. **Taylor, D. E.** 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol* **7**:111-115.
250. **Taylor, D. E., M. Rooker, M. Keelan, L. K. Ng, I. Martin, N. T. Perna, N. T. Burland, and F. R. Blattner.** 2002. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol* **184**:4690-4698.
251. **te Loo, D. M., A. E. Heuvelink, E. de Boer, J. Nauta, J. van der Walle, C. Schroder, V. W. van Hinsbergh, H. Chart, N. C. van de Kar, and L. P. van den Heuvel.** 2001. Vero cytotoxin binding to polymorphonuclear leukocytes among households with children with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **184**:446-450.
252. **Tobe, T., and C. Sasakawa.** 2002. Species-specific cell adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by type IV bundle-forming pili. *Cell Microbiol* **4**:29-42.
253. **Toma, C., E. Martinez Espinosa, T. Song, E. Miliwebsky, I. Chinen, S. Iyoda, M. Iwanaga, and M. Rivas.** 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **42**:4937-4946.
254. **Tomoyasu, T., A. Takaya, Y. Handa, K. Karata, and T. Yamamoto.** 2005. ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **253**:59-66.
255. **Torres, A. G., J. A. Giron, N. T. Perna, V. Burland, F. R. Blattner, F. Avelino-Flores, and J. B. Kaper.** 2002. Identification and characterization of

- lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun **70**:5416-5427.
256. **Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. Infect Immun **71**:4985-4995.
257. **Torres, A. G., G. N. Lopez-Sanchez, L. Milflores-Flores, S. D. Patel, M. Rojas-Lopez, C. F. Martinez de la Pena, M. M. Arenas-Hernandez, and Y. Martinez-Laguna.** 2007. Ler and H-NS, Regulators Controlling Expression of the Long Polar Fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol **189**:5916-5928.
258. **Torres, A. G., and S. M. Payne.** 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol **23**:825-833.
259. **Tozzoli, R., A. Caprioli, and S. Morabito.** 2005. Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. J Clin Microbiol **43**:4052-4056.
260. **Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol **47**:595-606.
261. **Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Donnenberg, L. de Montigny, J. B. Kaper, and A. Donohue-Rolfe.** 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect Immun **63**:3621-3627.
262. **Tzipori, S., H. Karch, K. I. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers, and M. M. Levine.** 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Infect Immun **55**:3117-3125.
263. **Ullrich, H. J., W. L. Beatty, and D. G. Russell.** 1999. Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*. Eur Jour Cell Biol **78**:739-748.

264. **van Diemen, P. M., F. Dziva, M. P. Stevens, and T. S. Wallis.** 2005. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. *Infect Immun* **73**:1735-1743.
265. **Vareille, M., T. de Sablet, T. Hindre, C. Martin, and A. P. Gobert.** 2007. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10199-10204.
266. **Vartivarian, S. E., and R. E. Cowart.** 1999. Extracellular iron reductases: identification of a new class of enzymes by siderophore-producing microorganisms. *Arch Biochem Biophys* **364**:75-82.
267. **Voyich, J. M., K. R. Braughton, D. E. Sturdevant, C. Vuong, S. D. Kobayashi, S. F. Porcella, M. Otto, J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** 2004. Engagement of the pathogen survival response used by group A *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J Immunol* **173**:1194-1201.
268. **Voyich, J. M., D. E. Sturdevant, K. R. Braughton, S. D. Kobayashi, B. Lei, K. Virtaneva, D. W. Dorward, J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** 2003. Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1996-2001.
269. **Wagner, P. L., M. N. Neely, X. Zhang, D. W. Acheson, M. K. Waldor, and D. I. Friedman.** 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* **183**:2081-2085.
270. **Warawa, J., and B. Kenny.** 2001. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol Microbiol* **42**:1269-1280.
271. **Wells, J. G., B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, and G. K. Morris.** 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* **18**:512-520.

272. **Whittam, T. S., I. K. Wachsmuth, and R. A. Wilson.** 1988. Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **157**:1124-1133.
273. **Whittam, T. S., and R. A. Wilson.** 1988. Genetic relationships among pathogenic *Escherichia coli* of serogroup O157. *Infect Immun* **56**:2467-2473.
274. **Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Orskov, I. Orskov, and R. A. Wilson.** 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* **61**:1619-1629.
275. **Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N. F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B. Finlay.** 2006. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J Infect Dis* **194**:819-827.
276. **Wyckoff, E. E., D. Duncan, A. G. Torres, M. Mills, K. Maase, and S. M. Payne.** 1998. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **28**:1139-1152.
277. **Zaharik, M. L., V. L. Cullen, A. M. Fung, S. J. Libby, S. L. Kujat Choy, B. Coburn, D. G. Kehres, M. E. Maguire, F. C. Fang, and B. B. Finlay.** 2004. The *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun* **72**:5522-5525.
278. **Zhang, L., R. R. Chaudhuri, C. Constantinidou, J. L. Hobman, M. D. Patel, A. C. Jones, D. Sarti, A. J. Roe, I. Vlisidou, R. K. Shaw, F. Falciani, M. P. Stevens, D. L. Gally, S. Knutton, G. Frankel, C. W. Penn, and M. J. Pallen.** 2004. Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**:7282-7293.
279. **Zhang, W., M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Kuczius, and H. Karch.** 2005. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**:558-561.

280. **Zhang, Y., C. Laing, M. Steele, K. Ziebell, R. Johnson, A. K. Benson, E. Taboada, and V. P. Gannon.** 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics* **8**:121.
281. **Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.