

**Université de Montréal**

**Étude de l'effet des sucres dérivés du mucus et du régulateur NagC sur la formation de biofilm d'*E. coli* de différents pathotypes incluant les *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC)**

**par Jean-Félix Sicard**

**Département de pathologie et microbiologie**

**Faculté de médecine vétérinaire**

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

**Décembre 2017**

**©Jean-Félix Sicard**

## RÉSUMÉ

La couche de mucus intestinal est une barrière physique qui limite le contact entre les bactéries et les cellules épithéliales de l'hôte. De plus en plus d'études suggèrent que des métabolites produits par le microbiote peuvent être perçus de manière spécifique par des pathogènes. Cela aurait pour conséquence de moduler l'expression de leurs gènes de virulence. Plusieurs *E. coli*, commensaux ou pathogènes, sont capables de former des biofilms. Cette propriété favorise leur colonisation et leur résistance aux mécanismes immunitaires de l'hôte. Nous démontrons que le N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide sialique peuvent réduire la formation de biofilm de différentes souches. L'inactivation de la protéine régulatrice NagC, par ajout du NAG ou par mutation, réduit la formation de biofilm de la souche adhérente et invasive LF82 en condition statique. NagC serait donc un activateur de la formation de biofilm. De plus, le suivi en temps réel de la formation de biofilm LF82 en utilisant un système microfluidique a démontré que la mutation de *nagC* altère une étape précoce de la formation de biofilm chez cette souche.

### Mots clés :

*Escherichia coli*, AIEC, biofilms, biofilms intestinaux, mucus, mucine, N-acétyl-glucosamine

## ABSTRACT

The mucous layer is a physical barrier that limits the contact between bacteria and host epithelial cells. There is growing evidence that microbiota-produced metabolites can also be specifically sensed by pathogens as signals to induce or repress virulence genes. Many commensal and pathogenic *E. coli* are able to form biofilm. This property can promote their colonization and resistance to immune mechanism. We show that the mucin sugars N-acetylglucosamine (NAG) and sialic acid can reduce biofilm formation of *E. coli* strains. We demonstrated that the inactivation of the regulatory protein NagC, by addition of NAG or by mutation, reduced the biofilm formation of adherent and invasive strain LF82 in static condition. Thus, NagC could be an activator of biofilm formation. Interestingly, the real-time monitoring of biofilm formation of LF82 Biofilm using microfluidic system showed that the mutation of *nagC* impairs the early process of biofilm promotion of LF82.

### Key words:

*Escherichia coli*, AIEC, biofilms, intestinal biofilms, mucus, mucins, N-acetyl-glucosamine

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
1. Les <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.1 Les généralités .....	5
1.2 Les pathotypes d' <i>E. coli</i> .....	5
1.2.1 Les <i>E. coli</i> entéro-pathogéniques (EPEC) .....	6
1.2.2 Les <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques (EHEC) .....	6
1.2.3 Les <i>E. coli</i> entéro-agrégatives (EAEC) .....	7
1.2.4 Les <i>E. coli</i> entéro-toxinogènes (ETEC) .....	7
1.2.5 Les <i>E. coli</i> adhérentes et invasives (AIEC) .....	7
2. La formation de biofilm .....	9
2.1 Les biofilms et leur importance .....	9
2.2 Les étapes de formation de biofilm .....	9
2.3 La formation de biofilm des <i>E. coli</i> .....	10
2.3.1 L'adhésion et la formation de microcolonies .....	11
2.3.1.1 Les fimbriae de type 1 .....	11
2.3.1.2 Les curli .....	12
2.3.1.3 Les autotransporteurs .....	13

2.3.2	Maturation et formation de la matrice extracellulaire .....	14
2.3.2.1	Le poly-N-acetyl glucosamine .....	14
2.3.2.2	La cellulose .....	15
2.3.2.3	L'acide colanique .....	15
2.3.3	Le quorum sensing .....	16
2.3.3.1	Autoinducteur de type-1 .....	16
2.3.3.2	Autoinducteur de type-2 .....	17
2.3.3.2	Autoinducteur de type-3 .....	17
2.4	Les biofilms intestinaux .....	18
3.	La muqueuse intestinale .....	19
3.1	Le mucus intestinal .....	19
3.1.1	La composition du mucus .....	19
3.1.2	L'adhésion des <i>E. coli</i> au mucus .....	20
3.1.3	Le mucus comme source de nutriment .....	21
3.1.3.1	Les bactéries mucolytiques .....	22
3.1.3.2	La consommation de sucres intestinaux par les <i>E. coli</i> .....	22
3.1.4	La modulation génique des <i>E. coli</i> par les composants du mucus .....	23
3.1.4.1	Le fucose et le système à deux composantes FusKR .....	23
3.1.4.2	Le métabolisme du NAG et du NANA .....	24
3.1.4.3	La modulation des fimbriae de type 1 par le NAG et le NANA .....	25
3.1.4.4	La modulation des curli par le NAG .....	25
3.1.4.5	L'impact du NAG et du NANA sur le LEE des EHEC .....	26
3.1.5	L'inflammation et le mucus .....	27
3.2	Les maladies inflammatoires intestinales .....	27
3.2.1	La muqueuse intestinale des IBD .....	28
3.2.2	La dysbiose des IBD .....	28
3.2.3	L'implication des AIEC dans la maladie de Crohn .....	29
3.2.3.1	L'adhésion des AIEC à l'épithélium .....	29

3.2.3.2 La survie intracellulaire des AIEC .....	30
3.2.3.3 La formation de biofilm des AIEC .....	31
<b>MÉTHODOLOGIE et RÉSULTATS .....</b>	<b>33</b>
Article .....	34
Implication de l’auteur dans cet article .....	35
Authors .....	36
Abstract .....	37
Background .....	38
Methods .....	40
Bacterial strains and growth conditions .....	40
Mutagenesis and complementation .....	40
Static biofilm assay .....	41
Flowthrough biofilm assay (BioFlux device) .....	42
Detection of type 1 fimbriae .....	43
Quantitative real time PCR (qRT-PCR) .....	44
Results .....	45
NAG reduces biofilm formation of AIEC strain LF82 .....	45
NAG reduces specific biofilm formation of LF82 by inactivating the transcriptional regulator NagC .....	45
NagC is involved in the first steps of biofilm formation of LF82 in presence of a shear force .....	46
The mutation of <i>nagC</i> impaired the production of type 1 fimbriae of LF82 .....	47
The impact of mucus-derived sugars on biofilm formation varies among <i>E. coli</i> strains .....	47
Discussion .....	48
Conclusion .....	51
Additional Files .....	52
Abbreviations .....	52

Authors' contributions .....	52
Authors details .....	53
Acknowledgements .....	53
Competing interests .....	53
Funding .....	53
References .....	54
Figures & Tables .....	58
<b>DISCUSSION</b> .....	69
L'influence des sucres dérivés du mucus sur la formation de biofilm de LF82 .....	70
NagC est impliqué dans les étapes précoces de la formation du biofilm de LF82 .....	70
L'influence de NagC sur les fimbriae de type 1 chez LF82 .....	71
Les sucres dérivés du mucus affectent la formation de biofilm de souches provenant de différents pathotypes d' <i>E. coli</i> .....	72
L'utilisation du NAG comme potentiel anti-inflammatoire .....	74
<b>CONSLUSION</b> .....	75
<b>PERSPECTIVES</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	78
<b>ANNEXE</b> .....	92
Revue scientifique publié dans « Frontiers in Cellular and Infection Microbiology .....	93
Authors .....	94
Abstract .....	95
Introduction .....	96
The gastrointestinal mucus .....	97
Mucus composition .....	97
Role of the mucus layer .....	98
Mucin as a growth substrate .....	98
Mucolytic bacteria .....	99

Use of mucus-derived nutrients by pathogens .....	100
Bacterial adhesion to mucins .....	101
Interactions between mucin and surface proteins .....	101
Interactions between mucin and pili/fimbriae .....	102
Interactions between mucin and flagella .....	103
Bacterial biofilm and mucus .....	103
Role of mucin components in modulation of bacterial virulence .....	105
Modulation of mucin composition by bacteria .....	106
Modulation of mucin by pathogens .....	106
Mucin degradation by pathogens .....	107
Inflammation and mucins .....	108
Conclusion .....	108
References .....	114
Résultats non publiés .....	124
Introduction .....	125
Méthodologie .....	125
Conditionnement du milieu de culture par Bt .....	125
Formation de biofilm de la souche LF82 en milieu conditionné .....	125
Mesure de la concentration du NAG et du NANA dans le milieu conditionné par Bt .....	125
Résultats .....	126
La présence de mucus et le conditionnement par Bt n'affectent pas la formation de biofilm de LF82 .....	126
Discussion .....	128
Références .....	128



## LISTE DES TABLEAUX

### MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Table I: List of strains and plasmids used in this study ..... 60

Table SI. List of primers used in this study ..... 66

### ANNEXE

Table I: Bacterial adhesion to mucin components ..... 111

Table II: Effects of bacterial effectors on mucin ..... 112

## LISTE DES FIGURES

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Colonisation de l'épithélium intestinal par différents <i>E. coli</i> pathogènes .....	8
Figure 2. Différentes étapes de la formation de biofilm .....	10
Figure 3. Le mucus intestinal .....	20
Figure 4. Les sucres dérivés du mucus influencent l'expression génique d' <i>E. coli</i> .....	24
Figure 5. Mécanismes de régulation du NAG et du NANA .....	26
Figure 6. Facteurs de virulence des AIEC en lien avec les prédispositions génétiques de la maladie de Crohn .....	32

### MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Figure 1. Impact of mucus-derived sugars on biofilm formation of AIEC strain LF82 .....	61
Figure 2. NagC positively influence the biofilm formation of AIEC strain LF82 .....	62
Figure 3. The biofilm formation is delayed in <i>nagC</i> mutant of LF82 in a microfluidic system .....	63
Figure 4. NagC influences the expression and the production of type 1 fimbriae of LF82 .....	64
Figure 5. Mucus-derived sugars can influence the biofilm formation of different strains of <i>E. coli</i> .....	65
Figure S1. Monitoring of NAG consumption by LF82 WT, LF82 $\Delta$ nagC and the complemented strain when grown under static condition .....	67
Figure S2. NagC consensus DNA binding site generated by Weblogo from known NagC binding sequences .....	68

### CONCLUSION

Figure 7. Modèle de prévention de la formation de biofilm au niveau intestinal .....	75
--	----

### ANNEXE

Figure 1. Bacterial activities in the colonic mucus layer environment .....	113
Figure 2. La formation de biofilm de la souche AIEC LF82 dans un milieu avec ou sans mucus et conditionné par Bt .....	127

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

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

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

NAG: N-acétyl-glucosamine

NANA: Acide sialique ou acide N-acétylneuraminique

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

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

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

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

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

EPEC : *E. coli* entéro-pathogénique (Enteropathogenic *E. coli*)

EAEC : *E. coli* entéroagré-gative (Enteroggregative *E. coli*)

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

A/E : Attachement et Effacement

LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes

SST3 : Système de Sécrétion de Type 3

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

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

CD : maladie de Crohn (Crohn's Disease)

IBD : maladie inflammatoire intestinale (Inflammatory Bowel Disease)

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

LPF : Long fimbriae polaire (Long Polar Fimbriae)

Ag43 : Antigène 43

AIDA : Adhésine Impliquée dans l'Adhésion Diffuse

PGA : Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine

QS : Quorum Sensing

AI : Auto-Inducteur

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

ARNm : ARN messagers

PTS : Proline, Thréonine et Sérine

MucBP : Domaine pouvant lier le mucus

LPS : Lipopolysaccharide

ER : Réticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum)

OMP : Protéine de la membrane externe (Outer Membrane Protein)

AAF : Fimbriae d'adhérence agrégative (Aggregative Adherent Fimbriae)

DSS : Dextran de Sulfate de Sodium

NF- $\kappa$ B : Facteur Nucléaire kappa B (Nuclear Factor kappa-B)

OD: Densité optique (Optical Density)

LB: Milieu de culture LB (Lysogeny Broth)

LBWS: Milieu de culture LB sans NaCl (LB without salt)

PBS: Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)

SBF: Formation de biofilm spécifique (Specific Biofilm Formation)

cDNA: ADN complémentaire (complementary DNA)

Bt : *Bacteroides thetaiotaomicron*

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dre Josée Harel pour m'avoir permis de compléter une maîtrise dans son laboratoire et sur un sujet aussi passionnant. Votre encadrement fut d'une grande aide tout au long de mon cheminement. Votre rigueur et votre inspiration m'ont poussé à persévérer lors des moments plus difficiles.

Je tiens également à remercier Dr Guillaume Le Bihan pour ses conseils expérimentaux, particulièrement pour la construction du mutant et la méthode de culture de *Bacteroides*. Je le remercie également pour sa bonne humeur contagieuse. Je remercie aussi Joan Pena et Yaindrys Rodriguez Olivera pour leur apport majeur avec les qRT-PCR.

J'adresse un remerciement particulier à Philippe Vogelee, étudiant PhD du laboratoire, que j'ai eu la chance de côtoyer pendant la totalité de mon passage à Saint-Hyacinthe. Philippe m'a enseigné la quasi-totalité des techniques acquises lors de mes études à la maîtrise. Ses conseils concernant l'aspect scientifique de mon projet ont toujours été très utiles et reflètent ses compétences exceptionnelles en ce qui a trait à la science. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec lui.

Je remercie également les membres de mon comité conseil pour leurs judicieuses recommandations.

De plus, j'aimerais remercier mes amis, mes parents et ma sœur qui m'ont encouragé tout au long de mes études. Je remercie également ma copine Catherine qui a rendu mon séjour à Saint-Hyacinthe beaucoup plus agréable. Sa patience, son soutien et ses encouragements m'ont grandement aidé au cours de la dernière année.

Finalement, je remercie les membres du CRIPA, le soutien financier et la Faculté de médecine vétérinaire qui ont rendu ce projet réalisable.

## **INTRODUCTION**

Les *Escherichia coli* sont des entérobactéries qui colonisent le tractus digestif des mammifères et autres animaux à sang chaud. Elles font donc normalement parties de la flore commensale entérique. Bien qu'elles soient, de façon commune, inoffensives, certaines souches ont acquis des gènes de virulence les rendant pathogènes. Les *E. coli* causant des maladies peuvent être divisées en différents groupes, selon leur site d'infection intestinal (InPEC) ou extra-intestinal (ExPEC). Elles sont aussi classées par pathotype basé sur le type d'infection qu'ils causent et sur leur combinaison de facteurs de virulence spécifiques.

Lors de la colonisation du tractus digestif, les *E. coli* font face à divers obstacles. Un de ceux-ci est la couche de mucus intestinal qui tapisse les cellules épithéliales. Ce mucus est formé de glycoprotéines appelées mucines qui s'assemblent en polymère dense, bloquant l'accès des bactéries à l'épithélium. Par contre, plus le mucus est éloigné des cellules, moins il est dense et il devient alors permissif à la colonisation par une importante quantité de bactéries (Hansson and Johansson, 2010). Diverses chaînes d'O-glycans, dont la composition en résidus de sucres est hétérogène, se retrouvent dans la mucine et peuvent servir de sites d'adhésion aux *E. coli* (Juge, 2012). De plus, certaines espèces bactériennes présentes dans le mucus intestinal possèdent une activité dite mucolytique. Ces bactéries sécrètent des enzymes glycolytiques qui libèrent des disaccharides et des monosaccharides présents dans les polymères de mucines (Marcobal et al., 2013). Les *E. coli* sont incapables d'utiliser les sucres de la mucine sous leur forme complexe, mais peuvent les utiliser lorsqu'ils sont libérés par les bactéries mucolytiques (Bertin et al., 2013). En plus de servir de source de carbone, ces sucres dérivés du mucus peuvent également servir de signaux chimiques qui influencent l'expression génique des *E. coli*.

Plusieurs souches d'*E. coli* possèdent la capacité de former des biofilms (Pratt and Kolter, 1998a; Serra et al., 2013; Tremblay et al., 2015; Vogeleer et al., 2015). Les biofilms bactériens sont des amas structurés de bactéries, attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique. Ils jouent un rôle dans la protection des bactéries, augmentant leur résistance aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte (Jacques et al., 2010). Il demeure difficile d'affirmer que des bactéries intestinales, incluant les *E. coli*, peuvent former des

biofilms dans les intestins. L'étude des biofilms au niveau du mucus intestinal est complexe, principalement en raison du renouvellement rapide de mucus et d'un manque de technique permettant la conservation de l'intégrité de l'échantillon (de Vos, 2015). Toutefois des indices tels que le taux de transfert plasmidique entre bactéries et l'expression de facteurs de colonisation par les bactéries intestinales laissent croire en la présence de biofilms dans les intestins (Macfarlane et al., 1997; Licht et al., 1999; Hooper and Gordon, 2001). De plus, des biofilms de bactéries entériques ont déjà été observés à l'intérieur de gel de mucine artificielle dans un système de culture en continu, simulant l'environnement du colon (Macfarlane et al., 2005). Ils ont également été observés dans les biopsies de patient atteints de maladies inflammatoires intestinales tel que la maladie de Crohn (Swidsinski et al., 2005b).

Ainsi, notre hypothèse est qu'en homéostasie, les métabolites libérés par le microbiote, incluant les sucres dérivés du mucus, préviendraient la formation de biofilm par les *E. coli* pathogènes tandis qu'une altération de la couche de mucus et/ou une dysbiose intestinale favoriseraient celle-ci. Nous proposons donc que des métabolites de la flore intestinale, en influençant certaines voies métaboliques d'InPEC, influencent non seulement la virulence mais aussi leur capacité à former des biofilms. Ces métabolites pourraient donc être candidats comme molécules inhibitrices intéressantes.

Le but de cette étude est d'évaluer et caractériser l'influence des sucres dérivés du mucus tel que le N-acétyl-glucosamine (NAG), l'acide sialique (NANA) et le fucose sur la formation de biofilm des *E. coli* commensaux et aussi des *E. coli* pathogènes intestinaux. Les souches testées incluent des souches d'*E. coli* adhérentes et invasives (AIEC) impliquées dans les maladies inflammatoires intestinales ainsi que des souches entérohémorragiques (EHEC) causant des diarrhées sanguinolentes allant jusqu'à des atteintes rénales sévères appelées syndrome hémolytique et urémique.



## **REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **Première partie : Les *Escherichia coli***

### **1.1 Les généralités**

Les *Escherichia coli* sont des bactéries à Gram-négatif en forme de bacilles. Elles furent observées pour la première fois en 1885, par le bactériologiste allemand-autrichien Theodor Escherich et sont depuis un des micro-organismes le plus étudié (Dunne et al., 2017). Les *E. coli* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et on les retrouve communément dans la flore intestinale des mammifères où elles s'établissent comme des bactéries commensales. Elles peuvent être classées selon sa phylogénie, relation génétique avec un ancêtre commun, qui la divise en sous-groupes A, B1, B2, D1, D2/F et E (Dunne et al., 2017). De plus, les *E. coli* possèdent différents antigènes de surface qui permettent leur classification en sérotypes. Ainsi, l'antigène O fait référence au type de lipopolysaccharide, l'antigène H fait référence au type de flagelle et l'antigène K fait référence au type de capsule. Il existe une grande diversité génétique au sein de cette espèce bactérienne et bien qu'elles soient majoritairement inoffensives, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes et causer diverses maladies. Ces souches sont classées en différents pathotypes selon les maladies qu'elles causent et selon l'ensemble de leurs facteurs de virulence (Croxen and Finlay, 2010).

### **1.2 Les pathotypes d'*E. coli***

Parmi les souches pathogènes, on retrouve des *E. coli* causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) telles que la septicémie (SEPEC), la méningite néonatale (MNEC) et des infections urinaires (UPEC). D'autres *E. coli* vont plutôt causer des maladies intestinales (InPEC) (**Figure 1**). On parle, entre autres, des *E. coli* entéropathogéniques (EPEC), entérohémorragiques (EHEC), entéroagrégatives (EAEC) et entérotoxigènes (ETEC). Il existe également certaines ambiguïtés dans la classification des *E. coli*, comme c'est le cas chez les *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC). En effet, ce pathotype possède plusieurs facteurs de virulence retrouvés chez les ExPEC, mais est également impliqué dans des maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn.

### **1.2.1 Les *E. coli* entéropathogéniques (EPEC)**

Les EPEC sont l'une des principales causes de diarrhée potentiellement fatale chez les nourrissons des pays en voie de développement (Ochoa et al., 2008). Elles colonisent principalement le petit intestin et font partie d'un groupe de pathogènes causant des lésions d'attachement et effacement (A/E) de microvillosités aux cellules épithéliales intestinales (Kalita et al., 2014). Ce phénotype est attribuable à un groupe de gènes présent sur le locus d'effacement des entérocytes (LEE). Le premier gène de l'opéron LEE, *ler*, code pour un activateur qui régule l'expression du LEE (Le Bihan et al., 2017). L'une des principales composantes du LEE est le système de sécrétion de type III (SST3) qui permet aux bactéries attachées aux entérocytes d'injecter des protéines effectrices dans le cytoplasme de ceux-ci (Ochoa et al., 2008). Il s'en suit un réarrangement du cytosquelette de la cellule eucaryote formant une structure en forme de piédestal sous la bactérie, ce qui permet un contact intime entre les cellules (Chen and Frankel, 2005). La pathologie des lésions A/E est également retrouvée hors de l'espèce *E. coli*. La bactérie *Citrobacter rodentium* cause également ce type de lésion au niveau intestinal chez les souris ce qui en fait un modèle murin de choix pour l'étude des lésions A/E (Nataro and Kaper, 1998).

### **1.2.2 Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Les EHEC regroupent des *E. coli* pathogènes qui colonisent principalement le gros intestin et causent des diarrhées aqueuses et parfois sanguinolentes (colite hémorragique) (Kaper et al., 2004). Lors de cas plus sévères, une infection aux EHEC peut être la cause du syndrome hémolytique urémique (SHU), maladie potentiellement mortelle (Croxen and Finlay, 2010). Plusieurs facteurs de virulence sont associés à ce pathotype. Tout comme chez les EPEC, les EHEC possèdent le LEE, leur permettant de produire un SST3 au de causer des lésions A/E aux entérocytes (Kaper et al., 2004). Un autre facteur de virulence des EHEC est leur capacité à produire la Shiga toxine Stx codée par un phage. (Farfan and Torres, 2012). On retrouve cette capacité chez les *E. coli* producteurs de Shiga toxine (STEC), groupe qui inclut les EHEC. Le sérotype O157:H7 est reconnu comme principal responsable d'éclosions d'infection aux EHEC dans les pays développés (Croxen and Finlay, 2010).

### **1.2.3 Les *E. coli* entéroagréгатives (EAEC)**

Bien qu'elles soient reconnues pour provoquer des cas de diarrhée sporadiques, les EAEC sont également la cause de diarrhée persistante chez l'enfant et l'adulte tant dans les pays en voie de développement que dans les pays développés (Kaper et al., 2004). Elles ont un tropisme pour le petit intestin et le colon (Nataro and Kaper, 1998; Croxen and Finlay, 2010). Une caractéristique phénotypique des EAEC est leur adhésion en agrégat au niveau de la muqueuse intestinale de leur hôte, principalement médiée par les fimbriae d'adhérence agrégative. Cette agrégation de type « briques empilées » mène à la formation d'une structure mucoïde épaisse (Kaper et al., 2004; Kalita et al., 2014). Les EAEC vont également produire des toxines causant des dommages au niveau de la muqueuse intestinales (Croxen and Finlay, 2010).

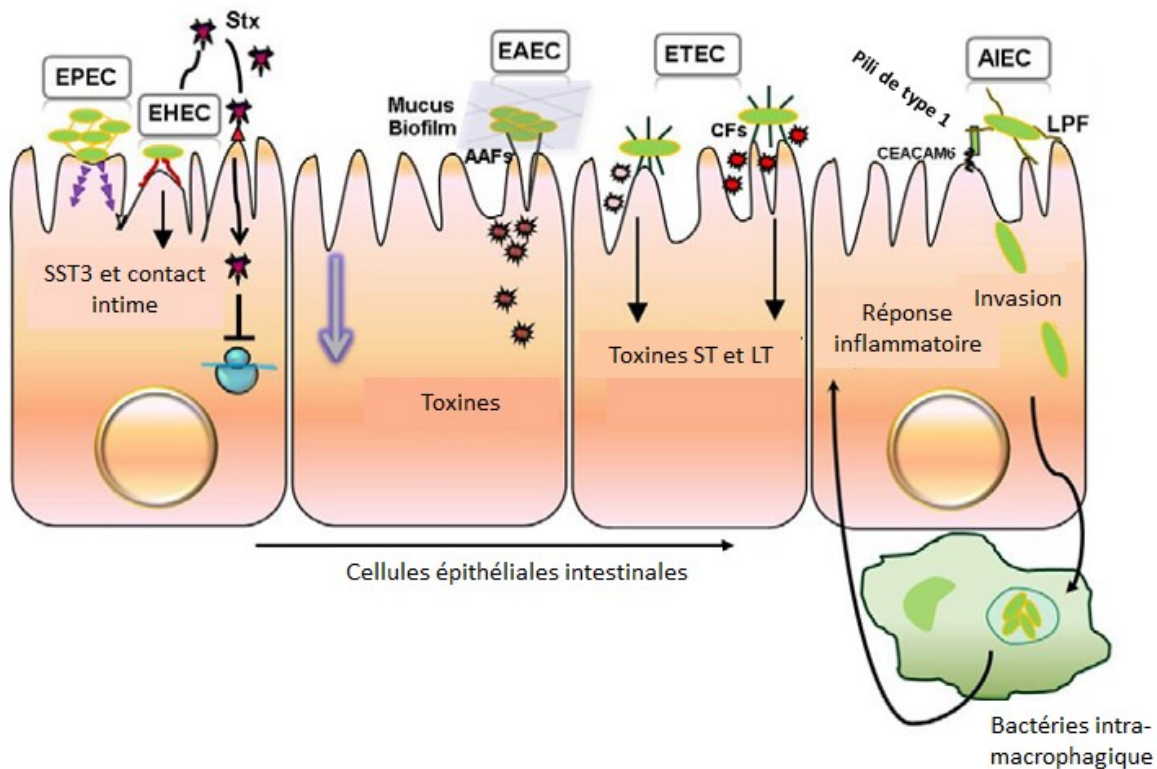
### **1.2.4 Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)**

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

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

Les AIEC forment un pathotype plutôt récent. Ces *E. coli* ont été isolées pour la première fois en 1998, de l'iléon de patients atteints de la maladie de Crohn (CD), une maladie inflammatoire intestinale (IBD) (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Elles étaient alors caractérisées par leur capacité à adhérer aux cellules intestinales. Il a ensuite été démontré qu'en plus d'être invasives (Boudeau et al., 1999), elles peuvent également survivre dans les macrophages et induire de l'inflammation en partie via la production de facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (Glasser et al., 2001). De plus, ces *E. coli* ne possèdent pas de gènes codant pour des facteurs de virulence fréquemment trouvés chez les souches d'*E. coli* causant des

maladies entériques aiguës (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Le séquençage de la souche AIEC de référence, LF82, a permis de déterminer la similitude évolutive entre les AIEC et les ExPEC du groupe phylogénétique B2 (Miquel et al., 2010). Les AIEC utilisent leurs fimbriae de type 1 pour adhérer aux molécules d'adhésion cellulaire associées à l'antigène carcino-embryonnaire 6 (CEACAM6) présentes au niveau des cellules intestinales de l'iléon (Barnich et al., 2007). Il a également été démontré que leurs longs fimbriae polaires (LPF) permettent d'interagir avec les plaques de Peyer également au niveau de l'iléon (Chassaing et al., 2011). Une autre caractéristique phénotypique des AIEC est leur plus forte capacité à former des biofilms que les souches intestinales non-AIEC (Martinez-Medina et al., 2009b).



**Figure 1.** Colonisation de l'épithélium intestinal par différents *E. coli* pathogènes. Les principaux mécanismes d'adhésion et/ou invasion des pathotypes EPEC, EHEC, EAEC, ETEC et AIEC sont illustrés. SST3; système de sécrétion de type 3, AAF; fimbriae d'adhérence agrégative, CF; facteur de colonisation, ST; thermostable, LT; thermolabile, LPF; longs fimbriae polaires. Figure adaptée de (Kalita et al., 2014).

## **Deuxième partie : La formation de biofilm**

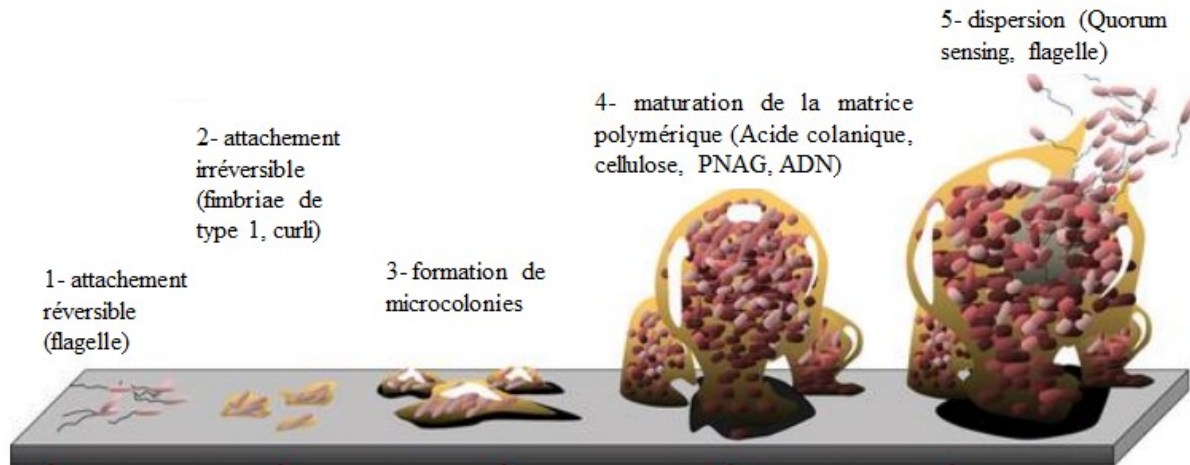
### **2.1 Les biofilms et leur importance**

Les biofilms bactériens sont des communautés structurées de bactéries englobées dans une matrice polymérique autoproduite qui est attachée à une surface (Jacques et al., 2010). Les biofilms peuvent contenir une seule ou plusieurs espèces bactériennes à la fois (Moons et al., 2009). La formation de biofilm est un processus dynamique qui peut être influencé par plusieurs facteurs environnementaux (Reisner et al., 2006). La croissance sous forme de biofilm procure une protection aux bactéries et favorise leur survie dans un milieu hostile. Ainsi, ils représentent un réservoir majeur de bactéries présentes dans l'environnement (Costerton et al., 1987). Les biofilms ont également un impact sur l'activité humaine, pouvant, par exemple, être présents dans les chaînes de production alimentaire (Mizan et al., 2015). Ils peuvent causer des infections dans des dispositifs médicaux permanents tel que les cathéters et les implants artificiels (Hall et al., 2014). Les bactéries présentes dans le biofilm seront plus résistantes aux antibactériens tels que les antibiotiques et au système immunitaire d'un hôte (Monroe, 2007). De cette façon, les bactéries présentes sous forme de biofilm au niveau respiratoire des patients atteints de fibrose kystique seront davantage résistantes aux antimicrobiens (Sherrard et al., 2014). Une corrélation a également été établie entre la formation de biofilm de bactéries causant des infections urinaires et la récurrence de ces infections (Tapiainen et al., 2014).

### **2.2 Les étapes de formation des biofilms**

La formation de biofilm peut être divisée en 5 différentes étapes (**Figure 2**). Initialement, les bactéries planctoniques, c'est-à-dire libres, doivent adhérer à une surface. L'utilisation d'adhésines telles que les fimbriae et les curli rendent l'attachement irréversible. Par la suite, il y a multiplication bactérienne, ce qui provoque la formation de micro-colonies. Les bactéries s'attachent alors les unes aux autres par l'entremise de leurs protéines de surface ce qui permet la maturation du biofilm. Il y a également production d'une matrice extracellulaire qui contient, entre autres, de l'acide colanique, de la cellulose, du poly-N-

acétyl-glucosamine et des acides nucléiques. Une fois la matrice bien en place, le biofilm est considéré mature. Le quorum sensing est un mécanisme de communication bactérienne utilisant des signaux moléculaires. Il permet la communication entre les bactéries au sein du biofilm, ce qui mène ultimement à leur dispersion sous une forme planctonique (Monroe, 2007; Jacques et al., 2010).



**Figure 2. Différentes étapes de la formation de biofilm. Les bactéries utilisent leurs appendices cellulaires afin d'adhérer à une surface. Elles vont ensuite se multiplier et produire une matrice polymérique formant un biofilm mature. Enfin, le quorum sensing favorise la dispersion des bactéries qui retrouvent leur forme planctonique. Figure adaptée de (Monroe, 2007).**

### **2.3 La formation de biofilm des *E. coli***

En ce qui concerne les *E. coli*, plusieurs souches possèdent la capacité de former des biofilms ce qui en fait une espèce bactérienne de choix pour l'étude de leur formation (Lavery et al., 2014; Hobley et al., 2015; Tremblay et al., 2015). Toutefois, la grande diversité génétique au sein de l'espèce fait en sorte que les gènes et les protéines utilisées lors de la formation de biofilm peuvent varier d'une souche à l'autre. Ainsi, que ce soit au niveau de la chaîne de production alimentaire (Giaouris et al., 2015), au moment d'infection du tractus urinaire (Subashchandrabose and Mobley, 2015) ou même lors de la colonisation des intestins (Rossi et al., 2017), la formation de biofilm des *E. coli* joue un rôle important.

### 2.3.1 L'adhésion et la formation de microcolonies

L'attachement efficace des *E. coli* à une surface, qu'elle soit biotique ou abiotique, dépend de facteurs environnementaux tels que la température, le pH, la charge ionique du milieu et le type de surface (Vogeleer et al., 2014). Il a été démontré que les flagelles jouent un rôle important lors de l'étape initiale d'attachement des *E. coli* (Pratt and Kolter, 1998b; Danese et al., 2000). Une fois attachées à une surface, les bactéries doivent également adhérer les unes aux autres. Plusieurs appendices de surface (fimbriae de type 1, curli, autotransporteur) sont alors utilisés par les *E. coli* (Klemm and Schembri, 2004).

#### 2.3.1.1 Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 ont été initialement caractérisés grâce à leur capacité d'adhésion à des récepteurs mannose-spécifiques retrouvés à la surface de certaines cellules eucaryotes (Duguid and Anderson, 1967). Ils forment le groupe d'adhésines le plus partagé chez les *E. coli*, étant présents chez environ 80% des souches (Klemm and Schembri, 2004).

Le groupe de gènes *fim*, qui est responsable de l'expression de ces fimbriae, contient 9 gènes qui encodent des composantes structurales, un système de transport spécifique et des gènes de régulation (Klemm et al., 1985; Klemm and Christiansen, 1987; 1990; Klemm, 1992). FimA forme la sous-unité structurale majeure du fimbriae et l'extrémité de celui-ci est une structure fibrillaire composée de FimF, FimG et FimH. FimH agit comme une adhésine reconnaissant spécifiquement le groupement mannose des récepteurs glycoprotéiques ou glycolipidiques. FimC et FimD sont impliqués dans le transport et l'assemblage des sous unités structurales (Schwan, 2011; Laverty et al., 2014). L'expression de ces gènes est contrôlée par un système d'inversion d'ADN. Une séquence d'ADN non codante en amont des gènes de structure des fimbriae contient le promoteur d'expression de ceux-ci (Abraham et al., 1985; Olsen and Klemm, 1994). Cette séquence agit comme un interrupteur, pouvant être inversée par deux recombinaisons FimB et FimE (Klemm, 1986). En inversant l'ADN du promoteur, les recombinaisons permettent l'activation et l'inactivation de l'expression des



fimbriae de type 1. Bien qu'il soit nécessaire à la biosynthèse des fimbriae (Valenski et al., 2003), le rôle exact du gène *fimI* est toujours inconnu (Schwan, 2011).

Les fimbriae de type 1 ont d'abord été associés aux biofilms formés à l'interface air-liquide. La formation de ces biofilms était sensible à l'ajout de D-mannose, indiquant l'implication de FimH, l'adhésine responsable des liaisons de type lectine spécifique au mannose (Old and Duguid, 1970; Krogfelt et al., 1990). Il a toutefois été démontré que différents variants de FimH pouvaient promouvoir la formation de biofilm de manière indépendante à la liaison au mannose (Schembri and Klemm, 2001). De cette façon, les allèles de *fimH* vont également dicter le rôle des fimbriae de type 1 dans la formation de biofilm des différentes souches d'*E. coli*. Ainsi, les EHEC O157:H7 n'utilisent pas ces fimbriae lors de leur formation de biofilm (Roe et al., 2001). À l'inverse, les fimbriae de type 1 représentent un des facteurs de virulence les plus importants des ExPEC, incluant les AIEC, et jouent un rôle important dans leur formation de biofilm (Martinez-Medina et al., 2009b; Schwan, 2011). En plus de permettre l'adhésion à diverses surfaces, FimH favorise également l'autoagrégation des *E. coli* (Schembri et al., 2001).

#### 2.3.1.2 Les curli

Les curli sont des fibres minces, de type amyloïde et qui ont des propriétés agrégatives. Ils ont d'abord été identifiés chez les *E. coli*, mais sont également présents chez d'autres bactéries à Gram négatif (Olsen et al., 1989). Leur expression varie au sein des *E. coli* (Ben Nasr et al., 1996).

Les gènes nécessaires à la synthèse des curli (*csg*) sont regroupés dans deux opérons divergents. L'opéron *csgBA* encode les protéines de structure des curli où CsgA forme la sous-unité majeure et CsgB la sous-unité mineure (Hammar et al., 1995). L'autre opéron, *csgDEFG*, produit le régulateur transcriptionnel CsgD, responsable de l'expression des gènes de structure (Hammar et al., 1995). Les protéines CsgE, CsgF et CsgG jouent un rôle dans le transport et l'assemblage des sous-unités à la surface de la bactérie.

Les curli sont impliqués dans les premières étapes de la formation de biofilm, favorisant l'adhésion initiale à une surface, mais également l'agrégation des bactéries (Klemm and Schembri, 2004). En général, leur production est dépendante de facteurs environnementaux, tel que la température et la concentration en sel (Barnhart and Chapman, 2006). L'expression du régulateur positif CsgD est optimale lors de la phase stationnaire des bactéries, à une température en deçà de 30°C et à une concentration faible en sels (Cimdins et al., 2017). Il a toutefois été démontré qu'une simple mutation au niveau du promoteur de *csgD* pouvait permettre d'outrepasser sa régulation température-dépendante chez certaines souches d'*E. coli* (Uhlich et al., 2001). Les curli sont également présents en grande quantité dans la matrice polymérique des biofilms et ils peuvent être identifiés suite à une croissance sur gélose contenant l'indicateur rouge de Congo (Zogaj et al., 2003).

### 2.3.1.3 Les autotransporteurs

Lors de la formation de microcolonies, l'adhésion entre cellules est également médiée par des adhésines nommées autotransporteurs. Le membre le plus étudié de cette classe de protéines est la protéine de membrane externe Antigène 43 (Ag43). Ag43 est présent chez la plupart des *E. coli*, incluant des souches pathogènes (Owen et al., 1996).

Le gène *agn43*, préalablement nommé *flu*, est responsable de l'expression de la protéine Ag43 qui est formée de deux sous-unités distinctes  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  fait partie intégralement de la membrane externe des *E. coli* et est requise pour la translocation de la sous-unité  $\alpha$  à travers cette même membrane. La sous-unité  $\alpha$  est présente sur la surface de la cellule bactérienne, toujours en interaction avec la sous-unité  $\beta$  (Hasman et al., 1999). Comme c'est le cas avec les fimbriae de type 1, l'expression d'Ag43 varie selon une phase active ou une phase inactive (Hasman et al., 2000). Le mécanisme de variation de phase est toutefois très différent. L'activation de l'expression d'*agn43* est médiée par la méthylation d'une séquence de 4 nucléotides (GATC) présente dans le promoteur du gène. Elle se produit via la méthyle transférase Dam. La méthylation de ces sites prévient la liaison du régulateur négatif d'*agn43*, OxyR (Henderson et al., 1997; Klemm and Schembri, 2004; Chauhan et al., 2013).

L'autoagrégation se produit par l'interaction de protéines Ag43 à la surface de deux bactéries distinctes (Hasman et al., 1999). L'expression d'*agn43* (auparavant *flu*) est également plus importante chez les bactéries sous formes de biofilm que chez les bactéries planctoniques (Schembri et al., 2003) et Ag43 favorise l'adhésion cellule à cellule dans les biofilms (Danese et al., 2000). Toutefois, la formation de biofilm en présence d'un flux dynamique de milieu n'influence pas la variation de phase d'*agn43*. Le processus de formation de biofilm favorise plutôt la sélection des bactéries en phase active et qui produisent donc Ag43 (Chauhan et al., 2013).

D'autres autotransporteurs du même type qu'Ag43 sont présents chez les *E. coli*. Plusieurs souches diarrhéiques expriment l'adhésine impliquée dans l'adhésion diffuse (AIDA-I). Cette adhésine favorise également l'autoagrégation des cellules via des liaisons AIDA-AIDA en plus d'être impliquée dans la formation de biofilm (Sherlock et al., 2004). Certaines ETEC possèdent également un autotransporteur, TibA, qui favorise la formation de biofilm via des interactions inter-microbiennes TibA-TibA (Sherlock et al., 2005).

### **2.3.2 Maturation et formation de la matrice extracellulaire**

Lors de la maturation du biofilm, les bactéries produisent une matrice extracellulaire. Cette matrice fournit un support aux bactéries présentes dans le biofilm en formant une structure tridimensionnelle qui englobe les micro-organismes. L'eau est l'une des principales composantes de la matrice permettant la protection des bactéries contre la dessiccation (Hobley et al., 2015). La matrice contient également des polysaccharides, des protéines, de l'ADN, des lipides et des glycolipides (Sharma et al., 2016a). Les biofilms des *E. coli* contiennent trois exopolysaccharides majeurs, le poly- $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA), la cellulose et l'acide colanique (Sharma et al., 2016a).

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

Le PGA est un exopolysaccharide produit par les *E. coli* et dont l'expression dépend de l'opéron *pgaABCD* (Wang et al., 2004). Cet opéron produit différentes protéines, incluant la glycosyltransférase PgaC qui est impliquée dans la synthèse, l'export et la localisation du

polymère à la surface cellulaire. La présence du PGA favorise l'adhésion cellule à cellule, l'attachement du biofilm à une surface et la stabilisation structurelles du biofilm (Agladze et al., 2005). La présence du PGA peut être essentielle au maintien de la structure du biofilm (Wang et al., 2004). Le traitement au périodate de sodium (méta-périodate) dégrade le  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine provoquant une dépolymérisation du PGA. Son utilisation contre les biofilms des *E. coli* mène à la dispersion quasi complète des bactéries (Wang et al., 2004).

### 2.3.2.2 La cellulose

La cellulose est un homopolysaccharide composé d'unités de glucose liées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). On retrouve principalement ce polymère dans la paroi cellulaire des plantes, mais il est également produit par certaines espèces bactériennes, dont les *E. coli*. La cellulose est une des composantes principales de la matrice des biofilms des *E. coli* où elle joue un rôle architectural et protecteur (Zogaj et al., 2001; Serra et al., 2013). Les protéines impliquées dans la synthèse de la cellulose sont encodées par deux opérons divergents, *yhjR-bcsQABZC* et *bcsEFG* (Zogaj et al., 2001; Le Quere and Ghigo, 2009). Parmi le produit de ces gènes, la synthase BcsA catalyse la polymérisation de la cellulose à partir d'UDP-glucose (Le Quere and Ghigo, 2009; Whitney and Howell, 2013). L'activité de BcsA est contrôlée de façon allostérique par la liaison du second messager, le GMP-di-cyclique (Amikam and Galperin, 2006). BcsA contient un domaine PilZ dont la liaison au GMP-di-cyclique active la production de cellulose (Ryjenkov et al., 2006).

### 2.3.2.3 L'acide colanique

L'acide colanique est un polymère fait de glucose, galactose, fucose et d'acide glucuronique. Il est chargé négativement et forme une capsule protectrice autour des bactéries qui le produisent (Hanna et al., 2003). Toutefois, contrairement aux autres types de capsules, une grande portion de l'acide colanique produit par les bactéries est libéré dans le milieu extracellulaire (Beloin et al., 2008). Sa présence à la surface bactérienne lors de l'attachement initiale des bactéries nuit à l'adhésion de celles-ci masquant des adhésines tel que les autotransporteurs (Hanna et al., 2003). L'expression des gènes de synthèse de

l'acide colanique (*wca*) est tout de même régulée à la hausse dans un biofilm mature et jouerait donc un rôle dans la structure de ceux-ci (Domka et al., 2007). L'expression du groupe de gènes *wca* est induite par un système à trois composantes RcsC/RcsD/RcsB qui requiert également un régulateur transcriptionnel positif, RcsA (Majdalani and Gottesman, 2005).

### **2.3.3 Le quorum sensing**

Lors de la maturation du biofilm, la densité de population bactérienne augmente et l'expression de gènes des bactéries varie. Afin de coordonner l'expression génique au sein de la communauté, les bactéries utilisent un système appelé le quorum sensing (QS) (Walters and Sperandio, 2006). Ce système fonctionne par sécrétion et reconnaissance de molécules nommées autoinducteurs (AI) qui servent de signaux. Trois type d'AIs sont identifiés à ce jour et les *E. coli* produisent, sécrètent et reconnaissent deux d'entre eux, AI-2 et AI-3 (Walters and Sperandio, 2006; Vogeleeer et al., 2014).

#### *2.3.3.1 Autoinducteur de type-1*

Les homosérines lactones sous forme acylée (AHL) sont les molécules de signal du groupe d'autoinducteurs AI-1. Bien que les *E. coli* ne les produisent pas, elles possèdent un récepteur codé par le gène *sdiA*, homologue au gène *luxR*, qui reconnaît les molécules de signal AHL. Ainsi, au sein d'une communauté bactérienne, les *E. coli* peuvent reconnaître les signaux produits par d'autres espèces bactériennes (Walters and Sperandio, 2006; Vogeleeer et al., 2014). L'activation de SdiA par l'AHL favorise la formation de biofilm de souche K-12 en augmentant la transcription du gène *uvrY* (Suzuki et al., 2002). La protéine UvrY quant à elle, module positivement l'expression des fimbriae de type 1 puisqu'une mutation du gène *uvrY* mène à un phénotype sans fimbriae (Mitra et al., 2013). Un phénomène inverse a toutefois été démontré chez un EHEC O157:H7 où une mutation de *sdiA* provoque une augmentation de la formation de biofilm, causé par une plus grande production de curli (Sharma et al., 2010).

### 2.3.3.2 Autoinducteur de type-2

L'autoinducteur de type 2 est le diester de furanosyl borate qui est produit par les *E. coli* via l'expression du gène *luxS*. AI-2 est pris en charge par le complexe transporteur LsrABCD encodé par l'opéron *LsrACDBFG*. AI-2 est activé par phosphorylation via la kinase LsrK. Une fois actif, AI-2 peut lier le répresseur LsrR, permettant l'expression des gènes *lsr* (Li et al., 2007). Le système LsrRK affecterait la formation de biofilm en influençant des gènes liés à la production de l'Ag43 (*flu*) et de l'acide colanique (*wca*) (Li et al., 2007). Toutefois, la stimulation des biofilms par AI-2 dépend principalement d'une régulation de l'activité flagellaire favorisant l'autoagrégation des cellules (Ren et al., 2004). Cette régulation serait dépendante du système à deux composantes QseBC. Dans ce système, QseC agit comme une kinase tandis que QseB agit comme régulateur. QseB peut lier directement le promoteur *flhDC*, stimulant l'expression des flagelles. Bien que QseC ne réponde pas directement à AI-2, l'effet d'AI-2 sur les flagelles est dépendante de QseB suggérant une signalisation croisée entre AI-2 et d'autres systèmes de régulation (Gonzalez Barrios et al., 2006; Rossi et al., 2017). La cascade régulatrice causée par AI-2 et qui mène à une augmentation de la biomasse des biofilms impliquerait également le régulateur de motilité du quorum sensing (MqsR). MqsR agit en clivant des ARN messagers (ARNm) cibles et bien que son rôle direct n'ait pas été démontré, une mutation de *mqsR* interfère la régulation flagellaire QseBC-dépendante d'AI-2 (Gonzalez Barrios et al., 2006).

### 2.3.3.3 Autoinducteur de type-3

Bien que la structure chimique exacte de la molécule auto-inductrice de type-3 soit toujours indéterminée, elle semble être homologue des hormones épinéphrine et norépinephrine des mammifères (Sperandio et al., 2003; Rossi et al., 2017). AI-3 est produite par plusieurs souches d'*E. coli* intestinales, qu'elles soient pathogènes ou commensales (Clarke and Sperandio, 2005). Cette molécule est également détectée par la kinase QseC et peut donc influencer la formation de biofilm via QseB (Yang et al., 2014).

## **2.4 Les biofilms intestinaux**

La présence de biofilm au sein du mucus intestinal est difficile à évaluer. La forte densité bactérienne au niveau intestinal mène à la formation de communautés microbiennes caractéristiques des biofilms. Toutefois, la croissance rapide du mucus intestinal et le manque de techniques de préservation efficaces compliquent les études ciblant les biofilms intestinaux (de Vos, 2015). Certains éléments tel que le taux de transfert plasmidique et l'expression de facteurs de colonisation par les bactéries intestinales indiquent la possibilité que des biofilms y soient formés (Macfarlane et al., 1997; Licht et al., 1999; Hooper and Gordon, 2001). Des structures semblables aux biofilms ont également été observées par microscopie électronique et par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) au niveau du colon de souris, de rats, de singes et d'humains (Palestrant et al., 2004; Swidsinski et al., 2005a). La présence de biofilms est également associée aux IBD tel que la CD et la colite ulcéreuse où la densité bactérienne à la surface de la muqueuse est plus importante (Swidsinski et al., 2005b; Swidsinski et al., 2009).

## **Troisième partie : La muqueuse intestinale**

### **3.1 Le mucus intestinal**

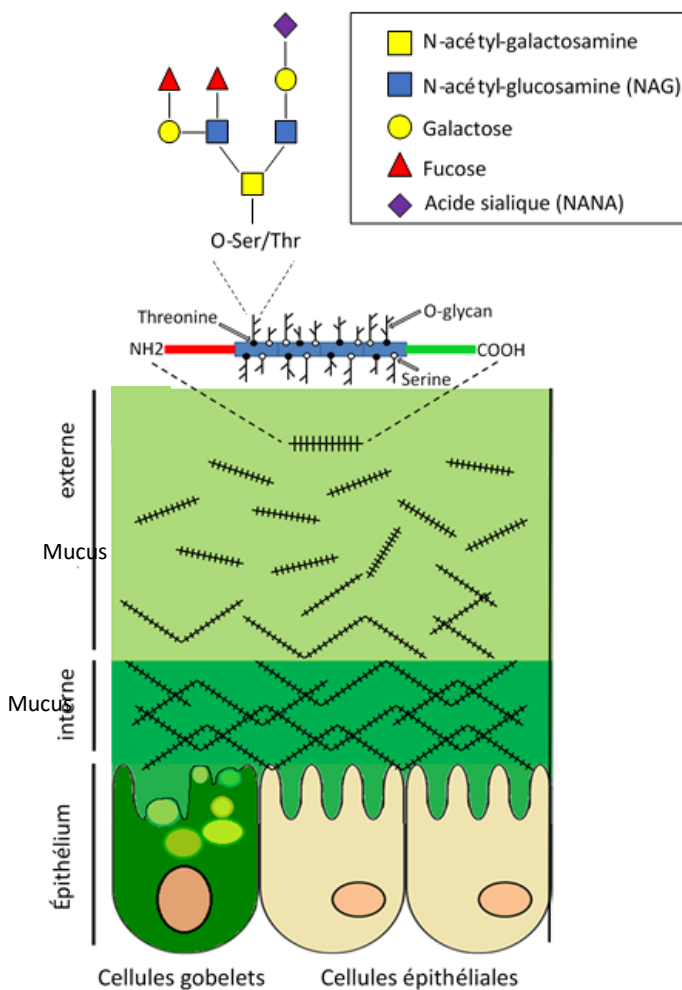
La muqueuse intestinale des mammifères contient une communauté bactérienne complexe, incluant des *Escherichia coli*, appelée microbiote intestinal. Les bactéries présentes dans le microbiote entretiennent une relation de commensalisme et/ou symbiose avec leur hôte. Divers mécanismes sont utilisés pour maintenir ce type de relation et éviter une réponse immunitaire aberrante contre le microbiote. L'un d'entre eux est la production d'une couche de mucus qui recouvre les cellules épithéliales intestinales fournissant une niche pour la colonisation bactérienne tout en empêchant l'accès à l'épithélium (Sicard et al., 2017). Le mucus contient en effet des sites d'attachement en plus de pouvoir fournir des sources de carbone aux bactéries (Sicard et al., 2017). Son renouvellement constant et son assemblage étanche permet de piéger les bactéries commensales, mais également pathogènes, prévenant leur accès aux cellules (Johansson et al., 2008; Bertin et al., 2013).

#### **3.1.1 La composition du mucus**

Le mucus intestinal est produit par des cellules intestinales spécialisées, les cellules en gobelets (Forstner, 1995). Son épaisseur varie tout au long du tractus gastrointestinal et c'est au niveau du colon qu'il est le plus épais (Juge, 2012). Il est principalement composé de glycoprotéines appelées les mucines. Lors de leur synthèse, ces protéines s'assemblent en polymères produisant une structure semblable à un filet. La densité du mucus diminue de l'épithélium au lumen formant une double couche de mucus (**Figure 3**). La couche interne, située à proximité des cellules, est exempte de bactéries chez un individu sain tandis que la couche externe est colonisée par le microbiote intestinal (Johansson et al., 2011; Nilsson et al., 2014). Les mucines possèdent un squelette peptidique auquel une multitude de glycanes sont attachés (Larsson et al., 2009; Moran et al., 2011). Ces peptides partagent une structure commune faite de répétition en tandem d'acides aminés (proline, thréonine et sérine) nommées les domaines PTS. Les domaines PTS fournissent les sites pour l'attachement covalent de polysaccharides et sont ainsi largement glycosylés (Moran et al., 2011). On



estime jusqu'à 80% de la biomasse des mucines est composée de ces glycanes (Johansson et al., 2009). Quatre différents types de noyaux polysaccharidiques sont normalement liés au squelette peptidique. Les combinaisons de trois polysaccharides, le galactose, le N-acétyl-galactosamine et le N-acétyl-glucosamine (NAG), forment ces noyaux auxquels différentes chaînes sucres sont attachés. Les monosaccharides terminaux sont généralement le fucose et l'acide sialique (**Figure 3**) (Larsson et al., 2009). Les glycoprotéines MUC1, MUC5AC et MUC6 sont les principales mucines au niveau gastrique tandis que MUC2 est la mucine la plus abondante au niveau du petit intestin et du colon (Moran et al., 2011).



**Figure 3. Le mucus intestinal.** Au niveau du colon, le mucus intestinal est divisé en deux couches distinctes, la couche externe et la couche interne. Le mucus est principalement constitué de glycoprotéines appelées les mucines. Les mucines sont sécrétées par les cellules gobelets et s'assemblent en filet formant un filtre pour les bactéries dont la densité diminue vers le lumen. Les mucines sont des protéines hautement glycosylées et plusieurs chaînes polysaccharidiques y sont attachées. Parmi ces polysaccharides, on retrouve des sucres tels que le N-acétyl-glucosamine, le fucose et l'acide sialique. Figure adaptée de (Sicard et al., 2017).

### 3.1.2 L'adhésion des *E. coli* au mucus

Pour coloniser de façon efficace le colon, les *E. coli* doivent d'abord pénétrer le mucus et il est probable que l'adhésion aux mucines y joue un rôle important (Moller et al., 2003). Les

glycans attachés aux mucines représentent un énorme répertoire de ligands potentiels pour les bactéries commensales et pathogènes (Robbe et al., 2004; Derrien et al., 2010). Il a été démontré que certaines ETEC et UPEC adhèrent aux oligosaccharides contenant de l'acide sialique présents dans le lait maternel. Cette adhésion interfère avec leur colonisation du tractus digestif des nourrissons suggérant une altération de l'adhésion des bactéries (Martin-Sosa et al., 2002). Les adhésines bactériennes, qu'elles soient des protéines de surfaces, des fimbriae ou des flagelles, peuvent reconnaître des patrons de carbohydrates présents dans les mucines et ainsi permettre l'attachement initial des bactéries (Sicard et al., 2017). Il existe plusieurs protéines ayant des domaines pouvant lier le mucus (MucBP) et la base de données Pfam en regroupe une grande quantité (Boekhorst et al., 2006). On les retrouve principalement chez les lactobacilles, mais également chez des pathogènes tel que *Listeria monocytogenes* (Mariscotti et al., 2014). La base de données n'inclue toutefois pas de domaine MucBP présent chez les *E. coli*. Les fimbriae F9 de certaines UPEC et K88 (F4) possèdent tout de même la capacité d'adhérer au mucus (Blomberg et al., 1993; Wurpel et al., 2014). Les flagelles de certaines souches d'*E. coli* permettent également l'adhésion au mucus. Chez la souche probiotique Nissle 1917, le flagelle de sérotype H1 médie l'adhésion à MUC2 en interagissant directement avec la glycoprotéine (Troge et al., 2012). Le flagelle peut également jouer un rôle important dans l'adhésion des *E. coli* pathogènes. Une mutation de *fliC*, gène codant pour l'unité structurale du flagelle, prévient l'adhésion au mucus d'une souche EHEC possédant un flagelle de sérotype H7 et d'une souche EPEC possédant un flagelle de sérotype H6 (Erdem et al., 2007). Le tropisme de ces flagelles cible le noyau de type 2 présent dans la glycoprotéine MUC2 (Ye et al., 2015).

### **3.1.3 Le mucus comme source de nutriments**

Une multitude de sucres sont attachés au squelette peptidique des mucines et constituent ainsi une source importante de nutriment pour le microbiote intestinal, incluant *E. coli*. Toutefois, *E. coli* ne peut consommer ces sucres sous leur forme polysaccharidique. Un sous-ensemble de bactéries présentes dans le microbiote possède une activité enzymatique leur

permettant de dégrader les glycanes des mucines. Ces bactéries mucolytiques relâchent ainsi des sucres moins complexes qui peuvent être consommés par les bactéries avoisinantes dont *E. coli* (Koropatkin et al., 2012; Ouwerkerk et al., 2013).

#### 3.1.3.1 Les bactéries mucolytiques

Le microbiote contient une variété d'espèces anaérobies tel que *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Ruminococcus gnavus* et *Ruminococcus torques* qui sont reconnues comme des spécialistes de la dégradation du mucus (Ouwerkerk et al., 2013). Ces bactéries possèdent des glycosidases qui leur permettent de digérer les sucres du mucus et ainsi relâcher, entre autres, du NAG, du NANA, du fucose, du N-acétyl-galactosamine et du galactose dans l'environnement intestinal. Ces sucres peuvent ensuite être consommés par les bactéries mucolytiques, mais également par les autres bactéries avoisinantes qui ne possèdent pas d'activité mucolytique.

#### 3.1.3.2 La consommation de sucres intestinaux par les *E. coli*

Le catabolisme des *E. coli* affiche une grande diversité, mais est toutefois limité principalement à l'utilisation de sucres simples, sous une forme mono ou disaccharidique (Conway and Cohen, 2015). Pour s'établir au niveau intestinal les *E. coli* doivent rivaliser pour les nutriments avec d'autres membres du microbiote (Freter et al., 1983). Comme les *E. coli* sont incapables d'utiliser les polysaccharides complexes du mucus (Hoskins et al., 1985), elles peuvent s'associer avec des bactéries mucolytiques comme *B. thetaiotaomicron* qui dégrade le mucus via des hydrolases extracellulaires (Conway and Cohen, 2015). Ainsi, les *E. coli* consomment les sucres qui sont dérivés du mucus sous leur forme de formes monosaccharidiques ou disaccharidiques (Fabich et al., 2008). Une étude sur la consommation de différents sucres dérivés du mucus par la souche de laboratoire MG1655, une *E. coli* K-12, démontre une préférence de la bactérie pour le gluconate, suivi du NAG, du NANA, du mannose, du fucose et du ribose (Chang et al., 2004). Ces préférences peuvent varier grandement entre les différentes souches. En effet, une autre étude avec les souches commensales HS et Nissle 1917 démontre que celles-ci consomment un profil différent de sucres intestinaux. Ainsi, la

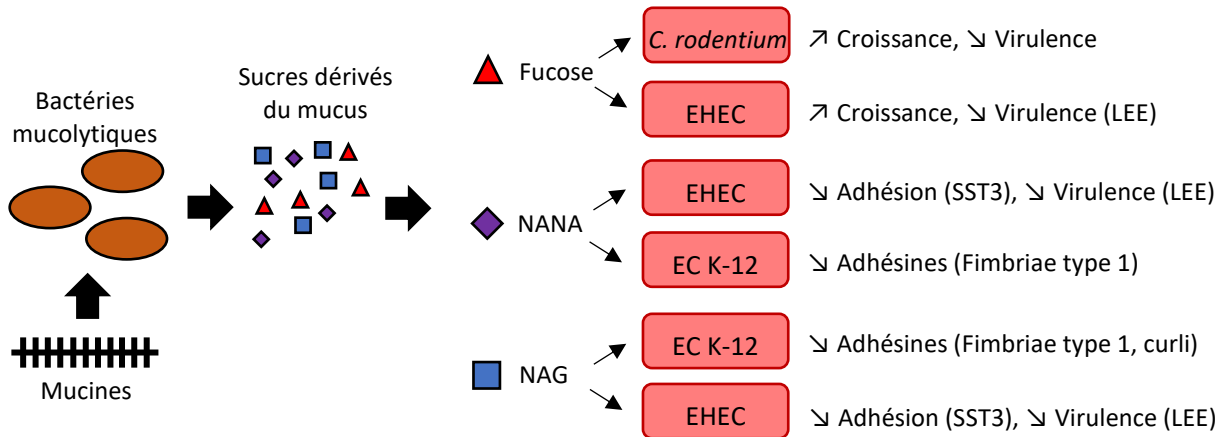
souche HS préfère le galactose au gluconate, suivi du NAG et du ribose. Elle n'utilise pas le NANA, le fucose et le mannose. À l'inverse, Nissle 1917 préfère le fucose au galactose puis au gluconate, au mannose et au NANA. Elle n'utilise ni le NAG, ni le ribose. Ces résultats suggèrent que les *E. coli* peuvent occuper des niches différentes lors de la colonisation intestinale (Maltby et al., 2013). Lors d'une infection intestinale, les *E. coli* pathogènes devront principalement rivaliser pour les nutriments avec les *E. coli* commensales. Il a été démontré que la souche EDL933, une EHEC O157:H7, consomme un profil de sucres différent que des souches commensales lors de la colonisation d'intestins de souris traitées à la streptomycine (Fabich et al., 2008; Maltby et al., 2013). Chez le bovin, EDL933 peut utiliser des sucres dérivés du mucus de manière préférentielle et plus rapidement qu'une souche bovine commensale (Bertin et al., 2013). Ainsi, la disponibilité des nutriments au niveau intestinal peut influencer l'adaptation des *E. coli* aux différentes niches et affecter leur colonisation.

#### **3.1.4 La modulation génique des *E. coli* par les composants du mucus**

En plus d'agir comme récepteurs et comme sources de carbone pour les *E. coli*, les composés du mucus peuvent également agir comme signaux chimiques détectés par les bactéries. Ces signaux permettent alors aux bactéries de moduler leur expression génique. Plusieurs études démontrent que des sucres dérivés du mucus tel que le NAG, le NANA et le fucose affectent l'expression de certains gènes chez *E. coli* (**Figure 4**).

##### *3.1.4.1 Le fucose et le système à deux composantes FusKR*

Les EHEC et *C. rodentium*, le model murin de lésions A/E intestinales, possèdent un système à 2 composantes nommés FusKR tandis qu'il est absent de la majorité des souches d'*E. coli* (Hernandez-Doria and Sperandio, 2013). FusK est une histidine kinase qui reconnaît le fucose et peut par la suite activer le régulateur FusR. FusR réprime l'expression de *ler*, le régulateur du LEE qui est en grande partie responsable de la virulence des EHEC (Pacheco et al., 2012). Cette réduction de la virulence serait également couplée à une croissance accrue de la bactérie (Keeney and Finlay, 2013; Vogt et al., 2015).



**Figure 4.** Les sucres dérivés du mucus influencent l'expression génique des *E. coli*. Lorsque l'activité enzymatique des bactéries mucolytiques relâche des monosaccharides provenant du mucus, les *E. coli* avoisinantes peuvent consommer ces sucres. En plus de servir de source de carbone, ces sucres influencent l'expression génique de certains gènes via divers mécanismes. Figure adaptée de (Sicard et al., 2017).

#### 3.1.4.2 Le métabolisme du NAG et du NANA

Le catabolisme du NAG et du NANA chez les *E. coli* utilisent des voies convergentes. L'utilisation du NAG est contrôlée par les gènes de l'opéron divergent *nagE* et *nagBACD* où NagE agit comme transporteur membranaire du NAG et NagC agit comme régulateur transcriptionnel (Plumbridge and Vimr, 1999). Lorsque le NAG est présent dans l'environnement, il entre dans la cellule via NagE et est immédiatement transformé en NAG-6-Phosphate (NAG-6-P). De plus, le catabolisme du NANA mène également à la synthèse de NAG-6-P intracellulaire (Plumbridge and Vimr, 1999). Le NAG-6-P joue un rôle dans la modulation génique en inactivant le régulateur NagC (**Figure 5A**). En absence de NAG-6-P, NagC est actif et réprime l'expression des gènes de son opéron (**Figure 5B**). Il est également un activateur de l'opéron *glmUS* qui promeut la synthèse d'UDP-NAG, important lors de la croissance cellulaire (**Figure 5C**) (Plumbridge, 1995; Konopka, 2012). Toutefois, lorsque le NAG-6-P est présent, il se lie au régulateur NagC ce qui l'inactive et permet l'expression des gènes de l'opéron du catabolisme du NAG au détriment des gènes de synthèse (Plumbridge and Kolb, 1991; Konopka, 2012).

#### 3.1.4.3 La modulation des fimbriae de type 1 par le NAG et le NANA

Chez la souche de laboratoire K-12 MG1655, la présence de NAG ou de NANA dans l'environnement provoque une diminution de l'expression de *fimB*. FimB est une recombinase qui catalyse la variation de phase permettant l'expression des fimbriae de type 1. Cette action du NAG sur les fimbriae de type 1 est dépendante de l'inactivation de NagC par le NAG-6-P. En effet, lorsqu'il est actif, NagC peut lier l'ADN en amont de *fimB*, favorisant l'expression de la recombinase (**Figure 5D**). (Sohanpal et al., 2004). Le NANA, en plus de mener à la formation de NAG-6-P, provoque l'inactivation de NanR, un autre activateur de l'expression de *fimB* (**Figure 5D**) (Sohanpal et al., 2004). Les fimbriae de type 1 sont présents chez plusieurs *E. coli* commensales, mais représentent également un facteur de virulence important des *E. coli* impliqués dans les infections urinaires et dans la maladie de Crohn (Croxen and Finlay, 2010).

#### 3.1.4.4 La modulation des curli par le NAG

Lors de son internalisation, le NAG-6-P est également modifié par la désacétylase NagA qui retire le groupement acétyl formant du glucosamine-6-P. NagB retire ensuite le groupement amine, formant du fructose qui pourra être utilisé pour la glycolyse (Plumbridge, 1991). Une mutation de *nagA* mène à l'accumulation de NAG-6-P intracellulaire chez la souche K-12 C600. Cette mutation provoque une diminution de l'expression et de la production de curli. Un phénotype semblable, bien que moins important, est observable lors d'une mutation du gène *nagC*. La suppression de NagC provoque l'expression constitutive des gènes de l'opéron *nag*. Toutefois, chez un double mutant  $\Delta nagAE$  et  $\Delta nagCE$ , où le transporteur NagE est également absent, le phénotype sauvage de production de curli est restauré. Ces résultats suggèrent que le défaut de production de curli serait causé par l'accumulation de NAG-6-P au niveau intracellulaire que ce soit par l'inactivation de la désacétylase NagA ou par une surexpression de NagE via la mutation de *nagC* (**Figure 5E**) (Barnhart et al., 2006).

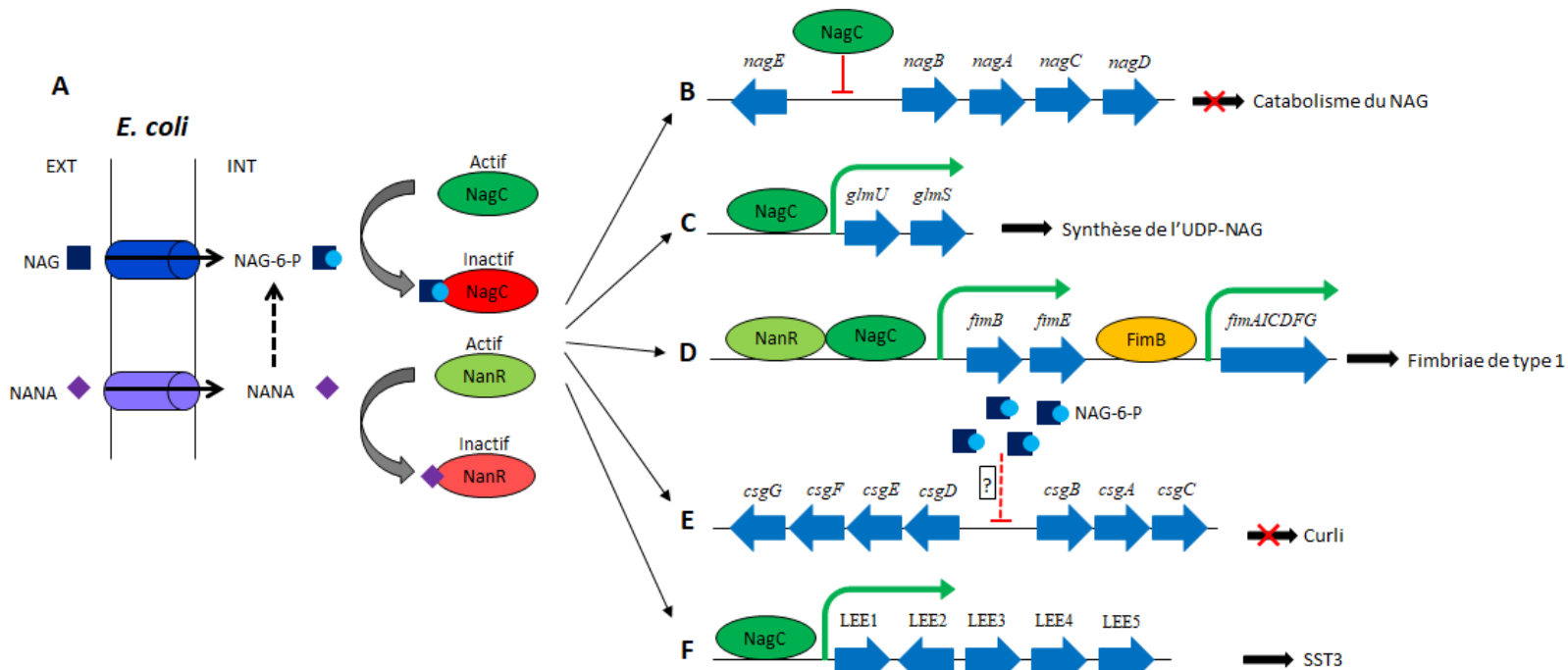


Figure 5. Mécanismes de régulation du NAG et du NANA. Chez les *E. coli*, le catabolisme du NAG et du NANA mène à la formation de NAG-6-P intracellulaire. Le NAG-6-P et le NANA inactivent les régulateurs transcriptionnels NagC et NanR respectivement. NagC, lorsqu'il est actif, agit comme répresseur des gènes du catabolisme du NAG et comme activateur des gènes de synthèse de l'UDP-NAG, des fimbriae de type 1 et même du LEE des EHEC. Le NAG-6-P ou NagC sont potentiellement impliqués dans l'expression des curli par un mécanisme toujours inconnu. NanR est également impliqué dans l'expression des fimbriae de type 1. Figure adaptée de (Le Bihan et al., 2017).

### 3.1.4.5 L'impact du NAG et du NANA sur le LEE des EHEC

Le NAG et le NANA sont également impliqués dans la virulence des EHEC. Il a été démontré qu'en condition micro-aérobie, la présence de chacun de ces sucres comme seule source de carbone provoque une augmentation de la sécrétion d'EspB, une molécule effectrice encodé par le LEE (Carlson-Banning and Sperandio, 2016). Il a toutefois été démontré qu'en milieu plus riche (DMEM), la présence de NAG et de NANA réduit significativement l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales HeLa (Le Bihan et al., 2017). Cette adhésion survient principalement via la production du SST3 encodé par le LEE des EHEC (Branchu et al., 2014). La transcription des gènes du LEE est également réduite suite à l'ajout de ces sucres par un mécanisme dépendant de NagC, mais pas de NanR. Il a été démontré que NagC peut interagir

avec le promoteur LEE1 et ainsi favoriser l'expression de *ler* (**Figure 5F**) (Le Bihan et al., 2017). La co-infection de souris traitées à la streptomycine avec la souche sauvage EDL933 et le mutant EDL933 $\Delta$ *nagC* démontre une meilleure aptitude à la colonisation chez la souche sauvage. De plus, l'administration de NAG dans l'alimentation de ses souris réduit la capacité de la souche EDL933 sauvage à coloniser leurs intestins. Le même effet est observé lors du prétraitement des souris avec la bactérie mucolytique *B. thetaiotaomicron* qui provoque une augmentation de la concentration de NAG dans l'environnement intestinal (Le Bihan et al., 2017).

### **3.1.5 L'inflammation et le mucus**

Au niveau intestinal, l'inflammation peut avoir un impact important sur la production de mucus. Chez des souris axéniques, la couche de mucus intestinal est moins épaisse en comparaison à celle des souris conventionnelles. Lorsqu'elles sont exposées à des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPS), tels que les lipopolysaccharides (LPS) et le peptidoglycane, les cellules intestinales de souris axéniques augmentent leur sécrétion de mucus. Ce phénomène n'est pas observé chez les cellules de souris conventionnelles qui possèdent déjà une épaisse couche de mucus (Pettersson et al., 2011). Le LPS favorise également l'expression et la sécrétion de mucine chez une lignée cellulaire de cellules gobelets humaines (Smirnova et al., 2003). Cette même étude démontre aussi une augmentation de la sécrétion d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire, qui corrèle avec la production de mucine (Smirnova et al., 2003).

## **3.2 Les maladies inflammatoires intestinales**

Une altération de la muqueuse intestinale est généralement associée à des problèmes de santé tel que la CD et la colite ulcéreuse, les deux principales IBD (Sicard et al., 2017). Ces maladies se manifestent généralement par des douleurs abdominales et rectales ainsi que par des diarrhées sanguinolentes. Les IBD sont multifactorielles et leur étiologie exacte demeure inconnue à ce jour. Elles impliquent des prédispositions génétiques, des variations du microbiote intestinal (dysbiose) et une réponse immunitaire aberrante (Cornick et al.,



2015). L'alimentation est également un facteur de risque et la diète occidentale augmente les risques de développer une IBD (Chapman-Kiddell et al., 2010).

### **3.2.1 La muqueuse intestinale des IBD**

La muqueuse des personnes atteintes d'IBD est altérée et plus perméable aux bactéries (Swidsinski et al., 2002; Mankertz and Schulzke, 2007; Jager et al., 2013). Pour la UC, cette altération est en partie due à une déplétion des cellules gobelets qui résulte en une couche de mucus plus mince (Pullan et al., 1994). On observe également une réduction de la glycosylation des mucines (Larsson et al., 2011). Chez les patients atteints de CD, la couche de mucus est essentiellement continue, mais contient une quantité réduite de glycoprotéines et une plus grande proportion de composantes différentes des mucines (Strugala et al., 2008). Certaines études suggèrent des associations entre différentes allèles génétiques et un défaut de l'expression des mucines par les cellules intestinales des personnes atteintes de ces maladies (Kyo et al., 1999; Kyo et al., 2001; Moehle et al., 2006; Dorofeyev et al., 2013). Un autre facteur impliqué dans l'altération de la muqueuse des IBD serait la réponse au stress du réticulum endoplasmique (ER), un mécanisme cellulaire en lien avec le mauvais repliement des protéines (Kaser et al., 2008; Hosoi and Ozawa, 2009). Ainsi, des problèmes d'assemblage des mucines causant un stress ER joueraient un rôle dans ces maladies (Heazlewood et al., 2008; McGuckin et al., 2011; Luo and Cao, 2015).

### **3.2.2 La dysbiose des IBD**

La flore intestinale des personnes atteintes d'IBD possède généralement une diversité bactérienne plus faible et moins stable que celle des personnes saines (Carding et al., 2015). Cette différence se traduit par une diminution de l'abondance relative du phylum *Firmicutes* et une augmentation de l'abondance relative du phylum des *Bacteroidetes* et de la famille des *Enterobacteriaceae* (Joossens et al., 2011; Walker et al., 2011). L'altération de la muqueuse des IBD permet également une augmentation de la concentration de bactéries au niveau du mucus (Swidsinski et al., 2002). Cette éclosion de bactéries mène à la formation de communauté bactérienne caractéristique des biofilms (Macfarlane and Dillon, 2007). Dans

les biopsies intestinales de patients avec IBD, on observe une présence accrue de biofilms dans lesquels sont retrouvés *Bacteroides fragilis* ainsi que des *Enterobacteriaceae* (Swidsinski et al., 2005b). La famille des *Enterobacteriaceae* inclut les *E. coli* et les souches AIEC dont la prévalence est accrue lors de la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martinez-Medina et al., 2009a). Un autre facteur lié à la dysbiose des IBD est la diète occidentale. Chez un modèle murin, une alimentation riche en sucres et en gras provoque un déséquilibre de la flore intestinale favorisant l'infection aux AIEC (Martinez-Medina et al., 2014).

### 3.2.3 L'implication des AIEC dans la maladie de Crohn

Tel que mentionné plus haut, les AIEC sont adhérentes, invasives et peuvent survivre dans les macrophages provoquant une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tel que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Elles sont également de fortes productrices de biofilms en comparaison avec les souches intestinales non-AIEC. On les retrouve principalement au niveau de l'iléon (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Elles possèdent une résistance accrue aux peptides antimicrobiens (McPhee et al., 2014). La pathogenèse des AIEC est intimement liée à des prédispositions génétiques chez l'hôte (**Figure 6**) (Martinez-Medina and Garcia-Gil, 2014).

#### 3.2.3.1 L'adhésion des AIEC à l'épithélium

Pour se retrouver au niveau de l'épithélium de l'iléon, les AIEC doivent traverser une couche de mucus. Une étude récente démontre une association entre le phylogroupe B2 des AIEC et la production de la protéase Vat-AIEC ayant une activité mucolytique (Gibold et al., 2016). Cette protéase réduit la viscosité du mucus sans, toutefois, fournir des monosaccharides consommables à la souche référence LF82 (Gibold et al., 2016). Une fois arrivées à l'épithélium, les AIEC vont adhérer aux cellules. Plusieurs AIEC possèdent une mutation au niveau du gène *fimH*, composant des fimbriae de type 1 (Dreux et al., 2013). Cette mutation favorise l'adhésion aux récepteurs CEACAM6 qui sont présents au niveau des cellules intestinales de l'iléon et qui sont anormalement sur-exprimés chez les patients CD (Barnich et al., 2007). La production de flagelles par les AIEC est également importante pour l'adhésion

et serait liée à un processus de co-régulation de l'expression de fimbriae de type 1 (Barnich et al., 2003). Cette co-régulation implique le facteur sigma flagellaire FliA qui régule l'expression des deux composants (flagelle et fimbriae) par un mécanisme dépendant du di-GMP cyclique (Claret et al., 2007). Chez la souche de référence LF82, les vésicules de membrane externe contiennent la protéine transmembranaire OmpA. Cette protéine favorise l'invasion des cellules épithéliales intestinales en se liant à la chaperonne Gp96. Gp96 est impliqué dans la réponse au stress du ER et est également sur-exprimée à la surface des cellules de l'iléon des patients CD (Rolhion et al., 2010). La souche LF82 possède également des LPF, structures fimbriaires qui lui permettent d'interagir avec les cellules M, des cellules épithéliales qu'on retrouve au niveau des plaques de Peyer dans l'iléon (Chassaing et al., 2011). Il a été démontré que les sels biliaires favorisent l'expression de gènes codants pour LPF (Chassaing et al., 2013) et un problème de malabsorption des sels biliaires est courant chez les patients atteints de CD (Lenicek et al., 2011).

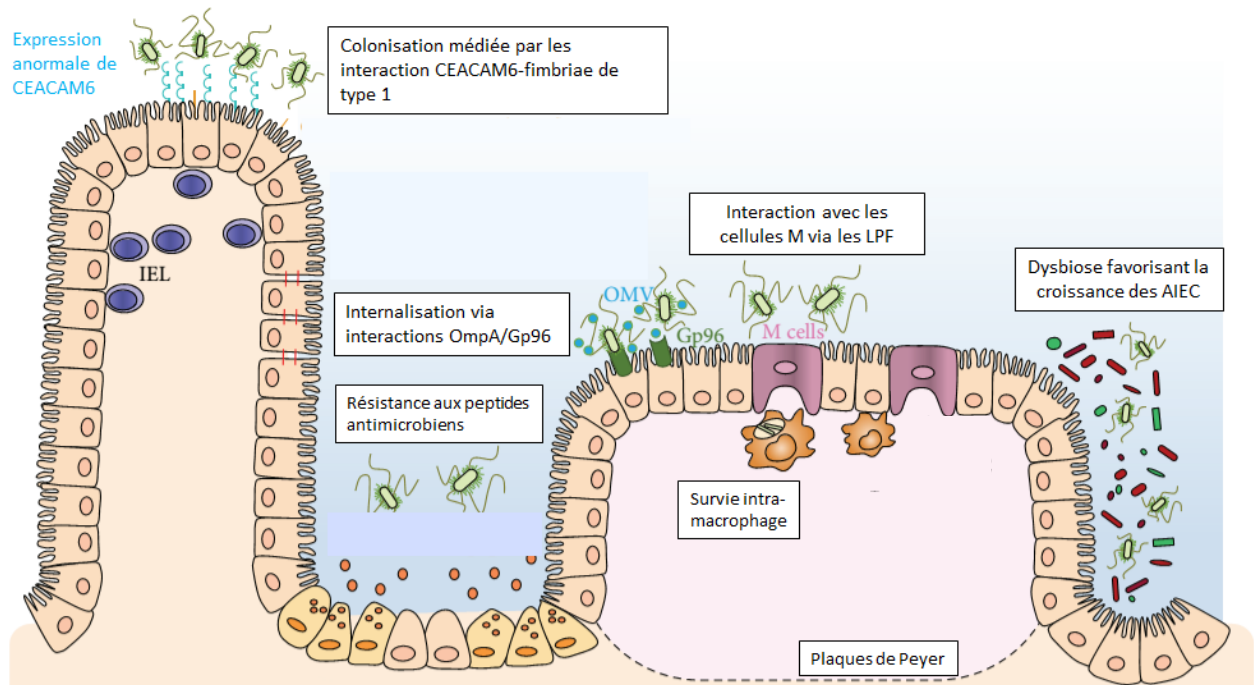
### *3.2.3.2 La survie intracellulaire des AIEC*

L'autophagie est un processus intracellulaire des cellules eucaryotes qui permet, entre autres, le recyclage de nutriments et l'élimination de compartiments endommagés du cytoplasme. Des différences nucléotidiques dans le gène *IRGM*, responsable de l'induction de l'autophagie, sont associées à une plus grande susceptibilité à la CD (Parkes et al., 2007). Les AIEC peuvent également moduler le niveau de microARN dans les cellules épithéliales intestinales afin de réduire l'autophagie et ainsi favoriser la réplication intracellulaire (Nguyen et al., 2014). Une mutation décalant le cadre de lecture du gène *NOD2* est également associée à une plus grande susceptibilité à la maladie de Crohn (Ogura et al., 2001). *NOD2* est un récepteur intracellulaire qui reconnaît des motifs moléculaires bactériens. Cette mutation perturbe la réponse immunitaire innée face à une infection par la souche LF82 (Peeters et al., 2007). Elle provoquerait une altération de l'interaction entre *NOD2* et la vimentine, un filament intermédiaire, se traduisant par un défaut d'autophagie, une invasion et une survie intracellulaire accrue des AIEC (Stevens et al., 2013). De plus, le locus *gimA* est associé aux AIEC du groupe phylogénétique B2 (Homeier et al., 2010). On

retrouve dans ce locus le gène *ibeA* qui code pour la protéine IbeA, impliquée dans l'invasion des cellules épithéliales intestinales et des macrophages (Cieza et al., 2015). À l'instar du processus d'invasion des cellules endothéliales du cerveau par les NMEC, les AIEC utiliseraient l'interaction entre IbeA et la vimentine au niveau des cellules intestinales pour favoriser leur invasion (Stevens et al., 2013).

### 3.2.3.3 La formation de biofilm des AIEC

Tel que mentionné plus haut, la présence de biofilms intestinaux est étroitement liée aux maladies inflammatoires intestinales. On retrouve dans ces biofilms des entérobactéries et les AIEC pourraient en faire partie. Les AIEC possèdent une formation de biofilm spécifique plus élevée que les souches intestinales non-AIEC. La présence des facteurs de virulence *ibeA*, codant pour l'invasine IbeA, et *sfa/focDE*, qui codent pour les fimbriae S et F1C, corrèle avec la formation de biofilm des AIEC. De plus, il existe également une corrélation positive entre la formation de biofilm, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales. (Martinez-Medina et al., 2009b). Ainsi, la capacité à former des biofilms serait liée à l'aptitude de colonisation des AIEC. Le facteur de régulation sigma-E (RpoE) est requis pour la formation de biofilm et sa présence est également nécessaire lors de la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2013). Impliqué dans la réponse au stress, RpoE permet entre autres le repliement des protéines de la membrane externe (OMP) (Rohion et al., 2007). Il régule également l'expression de l'opéron *waaWVL* chez la souche référence LF82. Cet opéron est impliqué dans la structure et la composition des lipopolysaccharides des AIEC et est également essentiel à leur formation de biofilm et leur capacité de colonisation de la muqueuse intestinale (Chassaing et al., 2015). La présence de différents sucres peut également influencer la formation de biofilm des AIEC. La maltodextrine est un polysaccharide dérivé de l'hydrolyse de l'amidon qui est utilisé comme épaississant, agent de remplissage ou agent de conservation dans de nombreux aliments transformés. Sa présence favorise grandement la formation des biofilms des AIEC, incluant LF82, par un mécanisme dépendant des fimbriae de type 1 (Nickerson and McDonald, 2012).



**Figure 6. Facteurs de virulence des AIEC en lien avec les prédispositions génétiques de la maladie de Crohn.** Les AIEC interagissent via leurs fimbriae de type 1 avec les CEACAM6 qui sont anormalement surexprimés à la surface des cellules épithéliales de l'iléon des patients CD. Elles interagissent également avec les Gp96 via leur protéine membranaire OmpA. Elles possèdent une résistance accrue aux peptides antimicrobiens. Elles traversent les cellules M au niveau des plaques de Peyer grâce à leurs LPF et peuvent survivre dans les macrophages. La dysbiose intestinale des patients CD favorise également leur croissance. Figure adaptée de (Agus et al., 2014).

Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'en absence de maladie, les *E. coli* pathogènes ne formeraient pas de biofilm dans les intestins en partie grâce à l'effet inhibiteur des sucres du mucus relâchés par le microbiote. Toutefois, une altération de la muqueuse et/ou du microbiote tel qu'observé chez les IBD modifie la mucine et par conséquent la sécrétion de sucres du mucus, ce qui pourrait expliquer la présence accrue de biofilms. Nous évaluons ainsi l'effet de différents sucres dérivés du mucus sur la formation de biofilm des *E. coli* et plus particulièrement des AIEC.

## **MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

**Article:**

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

**Soumis à:**

Gut Pathogens

### **Implication de l'auteur dans cet article.**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai rédigé la totalité de l'article. J'ai aussi effectué les expérimentations sur la formation de biofilm en condition statique et en condition dynamique ainsi que la mutagénèse dirigée. Ces expériences forment le cœur de l'article



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

Jean-Félix Sicard<sup>1</sup>, Philippe Vogeleer<sup>1</sup>, Guillaume Le Bihan<sup>1</sup>, Francis Beaudry<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>2</sup>  
and Josée Harel<sup>1\*</sup>.

\*Correspondence: [josee.harel@umontreal.ca](mailto:josee.harel@umontreal.ca)

## **Abstract**

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

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

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

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

## Background

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

The mucus layer that covers the intestinal epithelium plays a critical role in gut homeostasis. The intestinal mucus contains mucins which are highly O-glycosylated proteins. Mucins play an important role in shaping the intestinal microbiota as an alteration of the glycan availability modifies the microbiota composition [6]. By producing specific glycosidases, several species of the gut microbiota release sugars from O-glycans into the intestinal lumen [7, 8]. Released mucus-derived sugars, including N-acetylglucosamine (NAG), N-acetylneuraminic acid (NANA), galactose, fucose, mannose and N-acetylgalactosamine provide direct source of carbohydrates and promote the growth of commensal and pathogenic bacteria including *E. coli* [7-10]. In addition to their role as nutrients, some

mucus-derived sugars can act as regulatory signals that influence bacterial colonization and adherence to intestinal cells [11-14]. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) uses fucose, NAG and NANA as signaling molecules to modulate its metabolism and regulate the expression of its virulence repertoire [12, 15]. We recently showed that the catabolism of NAG and NANA inhibits EHEC adhesion to epithelial cells through down-regulation of the locus of enterocytes effacement expression under NagC regulatory control [16].

Biofilms could play a key role in bacterial colonization of the healthy gut and in intestinal diseases. Mucin has been reported to be involved in biofilm formation by *E. coli* [17, 18], suggesting its potential role in modulating *E. coli* colonization in the intestinal tract. The ability of biofilm formation *in vitro* varies extensively among *E. coli* isolates [19] and many *E. coli* strains are believed to form biofilm in the intestinal tract [20]. As such, AIEC are known to be higher biofilm producers than non-AIEC strains [21]. The ability to form biofilm could be part of the etiology of IBD since an increased presence of biofilms formed by the *Bacteroides fragilis* group and the *Enterobacteriaceae* family has been observed in intestinal biopsy specimens of people affected with these diseases [22, 23].

Alteration of the gut mucosal integrity and of microbiota could also change the mucus-derived sugars availability. Our hypothesis is that in healthy conditions, the integrity of the intestinal mucus and the functions of gut microbiota prevent biofilm formation of pathogenic *E. coli*. We evaluated the influence of mucus-derived sugars on biofilm formation of AIEC reference strain LF82. We show that NAG can reduce biofilm formation of LF82 and that the

transcriptional regulator of NAG catabolism, NagC appears to be involved in the early steps of its biofilm formation. We also showed that mucus-derived sugars can influence biofilm formation of different *E. coli* strains from other pathotypes.

## Methods

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

**Mutagenesis and complementation:** The LF82 $\Delta$ *nagC* mutant was constructed by allelic exchange using a suicide vector as described in our previous work [16]. Primers used for mutagenesis are listed in Table S1 (Additional File 1). Briefly, the suicide vector pMEG-375 containing the kanamycin resistance cassette from pKD13 flanked with 500 pb sequences upstream and downstream of the *nagC* open reading frame was transformed in a diaminopimelic acid auxotrophic *E. coli* strain  $\chi$ 7213 ( $\lambda$ pir and  $\Delta$ *asdA4*).  $\chi$ 7213 was used as a donor to transfer the plasmid in *E. coli* strain LF82 by conjugation. Single crossover mutants

were selected on LB agar without diaminopimelic acid, containing kanamycin. A second selection of double crossovers mutants was made using the *sacB* counterselection on LB agar without NaCl, containing 10% (wt/vol) of sucrose [24]. The mutation of *nagC* was confirmed by PCR and sequencing of an amplicon containing the region of interest. Complementation was performed using a derivative of the expression vector. The ORF of *nagC* was amplified in *E. coli* strain LF82 and inserted downstream of the pTrc promoter in the expression plasmid forming the *pnagC*. A resistance cassette of chloramphenicol was amplified from pACYC184 and inserted in *pnagC*, forming the *pnagC*-JFS.

**Static biofilm assay:** The assay of biofilm formation was done in 96-well microtiter plates as previously described [25]. Isolated colonies from LB agar were resuspended in fresh LB (5 ml) and incubated at 37°C with shaking (180 rpm). Overnight cultures were diluted (1:100) in fresh medium; either LB, LB without salt (LBWS) or M9 medium with 0.4 % glucose (wt/vol) and minerals (1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 μM FeCl<sub>3</sub>, 8 μM CaCl<sub>2</sub>, and 16 μM MnCl<sub>2</sub>). When required, the growth medium was supplemented with NAG, NANA or fucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1 mM. A volume of 150 μl of these cultures was deposited in triplicate in the wells. Plates were incubated either at 30 °C or 37 °C for 24 hours, without shaking. After incubation, total growth was measured at OD<sub>630</sub> with a microplate reader (PowerWave; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Afterwards, the media were discarded, and each well washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove unattached cells. The biofilms were stained with crystal violet 0.1 % (wt/vol) for 2 min at room temperature. The crystal violet solution was removed, and the biofilms washed

six times with PBS. Finally, an 80% (vol/vol) ethanol and 20% (vol/vol) acetone solution was added to release the stain and the amount of biofilm quantified by measuring at OD<sub>595</sub>. Specific biofilm formation (SBF) index was calculated [21, 26]. Results are the ratio of biofilm measured at OD<sub>595</sub> over total growth measured at OD<sub>630</sub>. To evaluate the effects of mucus-derived sugars addition on biofilm formation of different strains, one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values. To evaluate the impact of the mutation of *nagC* on AIEC strain LF82, two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

**Flow-through biofilm assay (BioFlux device):** The biofilm formation assay in the BioFlux 200 device (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA) was adapted from our previous work [25]. Biofilm formation occurs in the microfluidic channel of the device where fresh media constantly flow through causing a shear force that is similar to physiological condition [25]. *E. coli* strains were isolated on LB agar and resuspended in 5 ml of fresh LB medium. They were incubated overnight at 37 °C with shaking (180 rpm). A 0.5 ml volume of culture was transferred to a microtube and bacteria were collected by centrifugation (13,000g, 2 min). LB medium was used to resuspend the pellet to an OD<sub>600</sub> ≈ 1. Prewarmed LB ± NAG [1mM] was injected in the microfluidic system to fill the channels. Bacteria were injected from the output reservoir for 30 s at 0.5 dyne/cm<sup>2</sup>. The microfluidic plate was incubated at 30 °C for 2 h to allow the adhesion of bacteria on the surface of the channels. After adhesion, prewarmed LB ± NAG [1mM] was added to the inlet wells and the microfluidic plate was connected to the BioFlux system. Temperature was adjusted to 30°C and the flow was

initiated at 1.0 dyne/cm<sup>2</sup>. After 4 hours, the used medium was removed from the outlet well and prewarmed fresh medium was added in the inlet well. Flow was then reduced at 0.5 dyne/cm<sup>2</sup> for the next 18 hours. Images of the BioFlux biofilms were obtained with an inverted optic microscope equipped with a 40X objective (CKX41; Olympus, Markham, ON, Canada), a digital camera (Retiga EX; QImaging, Surrey, BC, Canada), and the software provided with the BioFlux 200 device. Images were treated using the software imageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) to quantify the amount of biofilm in the microfluidic channel. The 16-bit grayscale images were adjusted with the threshold function to include the bacterial structure before particle analysis. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values.

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



D-mannopyranose 5% (wt/vol) (Sigma-Aldrich) inhibited agglutination. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to calculate *p*-values.

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

## Results

### **NAG reduces biofilm formation of AIEC strain LF82**

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

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

#### **NagC**

The regulation of AIEC strain LF82 biofilm formation by NAG was further investigated. Because the activity of the regulator NagC is inactivated by the presence of NAG-6-P, a catabolic derivative of NAG, a mutant strain in *nagC* gene was created. The SBF index of LF82 $\Delta$ *nagC* mutant was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than the SBF index of the WT strain. This reduction of biofilm formation was similar to that observed upon the addition of NAG (Fig. 2). The wild-type phenotype was restored in the complemented strain expressing *nagC*.

Interestingly, no additional repression was observed upon the addition of NAG in the  $\Delta nagC$  mutant. This indicates that LF82 biofilm repression by NAG is NagC dependent.

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

To further investigate the role of NagC on biofilm formation of LF82, the dynamics of biofilm formation were monitored and visualized in real time using the BioFlux device (Fig. 3A). Real time imaging with LF82 clearly revealed the apparition of microcolonies 6 hours after the initiation of the flow. These microcolonies grow overtime and the production of polymeric matrix became more apparent at 10 hours. After 18 hours, the channel was almost entirely covered with biofilm. At 24 hours, mature biofilms were formed. The kinetics of biofilm formation of LF82 $\Delta nagC$  was different from that of the WT LF82. In early time points, a reduced number of microcolonies was observed in the mutant strain. Quantification results revealed a significant ( $P < 0.01$ ) decrease in biofilm coverage of the mutant strain when compared to the WT strain at 6 hours, 8 hours and 10 hours after the activation of the flow. At subsequent time point, the LF82 $\Delta nagC$  mutant biofilm structure was similar to that of the WT. Again, wild-type phenotype was restored in the complemented strain (Fig. 3A and 3B). This suggests that the *nagC* mutation impairs the first steps of biofilm formation of LF82 and involves surface adhesion and/or cell to cell interactions. In contrast to what we observed in static condition, supplementation of NAG did not affect biofilm formation in the microfluidic system.

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

To determine the role of type 1 pili in the NagC-dependent reduction of biofilm formation of LF82, the expression and production of type 1 fimbriae was evaluated in the mutant strain. The expression of *fimA*, encoding the major structural subunit of type 1 fimbriae, was measured in grown biofilms (Fig. 4A). Results showed a significant ( $P < 0.01$ ) reduction of 3.5-fold of *fimA* transcription in the LF82 $\Delta$ *nagC* strain when compared to WT strain (Fig. 4A). The expression of *fimA* was restored in the complemented strain. However, supplementation of NAG in medium had no effect on the expression of *fimA* in biofilm of LF82 (Fig. 4A). The production of type 1 fimbriae was measured by mannose-sensitive agglutination to *S. cerevisiae* and was significantly lower ( $P < 0.01$ ) by 2 Log<sub>2</sub> in LF82 $\Delta$ *nagC* mutant in comparison to WT strain (Fig. 4B). Type 1 pili production was restored in the complemented strain. Addition of NAG during growth did not affect the production of type 1 fimbriae. Taken together these results show that expression and production of type 1 fimbriae are regulated by NagC in LF82. However, addition of NAG had no significant impact on production of type 1 fimbriae.

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

Biofilm formation of a set of distinct *E. coli* strains was tested in different culture media to determine optimal conditions. LB medium was used for strains 17.2 and MG1655, whereas LBWS and M9 with glucose were the optimized culture media for biofilm formation of strains NC101 and EDL933 respectively. The effect of addition of NAG, NANA or fucose on biofilm formation was evaluated in static condition. The influence of mucus-derived sugars was

variable, strain-dependent and did not affect the growth of bacteria as measured with optical density (data not shown). Our data showed that the mean OD value of biofilm formed by murine strain NC101 was significantly decreased in the presence of the all three sugars ( $P < 0.01$ ). Supplementation of the medium with NAG ( $P < 0.01$ ) or NANA ( $P < 0.05$ ), significantly reduced biofilm formation of EHEC strain EDL933. A slight reduction was also observed upon the addition of NAG in EAEC strain 17.2 and K-12 strain MG1655 (Fig. 5).

## Discussion

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

We demonstrated that the effect of NAG on biofilm formation of AIEC strain LF82 is NagC-dependent. NagC is a repressor of *nag* operon involved in catabolism of NAG in *E. coli* [34,

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

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

In the present study, we show that NagC represses the gene expression and the production of type 1 fimbriae of AIEC strain LF82. This is similar to what was described in *E. coli* K-12 MG1655 [13]. Type 1 fimbriae are key factors that facilitate adhesion to a surface and cell-to-cell aggregation during establishment of biofilm on abiotic surfaces [37, 38]. They also participate in biofilm formation and in the adhesion-and-invasion process in AIEC [21, 39, 40]. Based on NagC consensus DNA binding site generated from known NagC binding sequences

[13, 16, 41, 42], two different binding sites were found upstream of the promoter of *fimB* recombinase in LF82. FimB is involved in the OFF-to-ON switching of type 1 fimbriation and sequences found in LF82 were identical and in the same distance to those of *fimB* promoter in K-12 strain MG1655 [13] (Additional File 3). This indicates that NagC control on type 1 fimbriae could influence at least in part the biofilm formation of LF82.

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

## Conclusion

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



## **Additional Files**

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

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

Additional File 3: NagC consensus DNA binding site and nucleotide BLAST of LF82 and MG1655.

## **Abbreviations**

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

## **Authors' contributions**

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

## **Author details**

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

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

## **Acknowledgements**

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

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding**

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

## References

1. Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Krogfelt KA: Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun* 1994, 62(11):5191-5194.
2. Torres AG, Zhou X, Kaper JB: Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 2005, 73(1):18-29.
3. Darfeuille-Michaud A: Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 2002, 292(3-4):185-193.
4. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF: High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127(2):412-421.
5. Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ: *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014, 5(3):213-227.
6. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI: Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 2008, 4(5):447-457.
7. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, Cohen PS, Conway T, Forano E, Martin C: Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 2013, 15(2):610-622.
8. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM et al: Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 2013, 502(7469):96-99.
9. Conway T, Cohen PS: Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 2015, 3(3).
10. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, McHargue JW, Hightower GA, Smith JT, Autieri SM et al: Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 2008, 76(3):1143-1152.
11. Barnhart MM, Lynem J, Chapman MR: GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006, 188(14):5212-5219.
12. Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, Sperandio V: Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 2012, 492(7427):113-117.
13. Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA, Blomfield IC: Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(46):16322-16327.
14. Vogt SL, Pena-Diaz J, Finlay BB: Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 2015, 34:106-115.
15. Le Bihan G, Jubelin G, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Martin C, Beaudry F, Harel J: Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 grown in vitro in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes. *Microbes Infect* 2015, 17(1):23-33.
16. Le Bihan G, Sicard JF, Garneau P, Bernalier-Donadille A, Gobert AP, Garrivier A, Martin C, Hay AG, Beaudry F, Harel J et al: The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and

- Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 2017, 7:134.
17. Bollinger RR, Barbas AS, Bush EL, Lin SS, Parker W: Biofilms in the normal human large bowel: fact rather than fiction. *Gut* 2007, 56(10):1481-1482.
  18. Bollinger RR, Everett ML, Wahl SD, Lee YH, Orndorff PE, Parker W: Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. *Mol Immunol* 2006, 43(4):378-387.
  19. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S: In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006, 188(10):3572-3581.
  20. Rossi E, Cimdins A, Luthje P, Brauner A, Sjolting A, Landini P, Romling U: "It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol* 2017:1-30.
  21. Martinez-Medina M, Naves P, Blanco J, Aldeguer X, Blanco JE, Blanco M, Ponte C, Soriano F, Darfeuille-Michaud A, Garcia-Gil LJ: Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 2009, 9:202.
  22. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H: Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7):3380-3389.
  23. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A: Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 2009, 60 Suppl 6:61-71.
  24. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR: A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 1991, 109(1):137-141.
  25. Tremblay YD, Vogeleeer P, Jacques M, Harel J: High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81(8):2827-2840.
  26. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodriguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F: Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* 2008, 105(2):585-590.
  27. Vogeleeer P, Tremblay YD, Jubelin G, Jacques M, Harel J: Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Appl Environ Microbiol* 2015, 82(5):1448-1458.
  28. Baumler AJ, Sperandio V: Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016, 535(7610):85-93.
  29. Dwivedi R, Nothaft H, Garber J, Xin Kin L, Stahl M, Flint A, van Vliet AH, Stintzi A, Szymanski CM: L-fucose influences chemotaxis and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 2016, 101(4):575-589.
  30. Baumler DJ, Peplinski RG, Reed JL, Glasner JD, Perna NT: The evolution of metabolic networks of *E. coli*. *BMC Syst Biol* 2011, 5:182.
  31. Meador JP, Caldwell ME, Cohen PS, Conway T: *Escherichia coli* pathotypes occupy distinct niches in the mouse intestine. *Infect Immun* 2014, 82(5):1931-1938.
  32. Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS et al: Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(19):7427-7432.

33. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T: Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 2013, 8(1):e53957.
34. Plumbridge J, Kolb A: CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1991, 217(4):661-679.
35. Plumbridge J, Kolb A: DNA loop formation between Nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of *Escherichia coli* in vivo. *Mol Microbiol* 1993, 10(5):973-981.
36. El Qaidi S, Plumbridge J: Switching control of expression of ptsG from the Mlc regulon to the NagC regulon. *J Bacteriol* 2008, 190(13):4677-4686.
37. Schembri MA, Christiansen G, Klemm P: FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2001, 41(6):1419-1430.
38. Pratt LA, Kolter R: Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 1998, 30(2):285-293.
39. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A: Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003, 48(3):781-794.
40. Nickerson KP, McDonald C: Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin. *PLoS One* 2012, 7(12):e52132.
41. El Qaidi S, Allemand F, Oberto J, Plumbridge J: Repression of galP, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. *Mol Microbiol* 2009, 71(1):146-157.
42. Plumbridge J: Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmUS operon and requires two separated NagC binding sites. *Embo j* 1995, 14(16):3958-3965.
43. Agus A, Massier S, Darfeuille-Michaud A, Billard E, Barnich N: Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int* 2014, 2014:567929.
44. Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP: Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* 2008, 62(5):762-769.
45. Azuma K, Osaki T, Kurozumi S, Kiyose M, Tsuka T, Murahata Y, Imagawa T, Itoh N, Minami S, Sato K et al: Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Carbohydr Polym* 2015, 115:448-456.
46. Bak YK, Lampe JW, Sung MK: Effects of dietary supplementation of glucosamine sulfate on intestinal inflammation in a mouse model of experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014, 29(5):957-963.
47. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF et al: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997, 277(5331):1453-1462.
48. Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA et al: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001, 409(6819):529-533.
49. Rich C, Favre-Bonte S, Sapena F, Joly B, Forestier C: Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 173(1):55-61.

50. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB: Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005, 128(4):891-906.
51. Roland K, Curtiss R, 3rd, Sizemore D: Construction and evaluation of a delta cya delta crp *Salmonella typhimurium* strain expressing avian pathogenic *Escherichia coli* O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis* 1999, 43(3):429-441.
52. Amann E, Ochs B, Abel KJ: Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988, 69(2):301-315.

## Figures & Tables

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

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

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

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

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

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

### **Figure 4. NagC influences the expression and the production of type 1 fimbriae of LF82.**

(A) The expression of type 1 fimbriae subunit *fimA* was measured by qRT-PCR in LF82 WT strain, its  $\Delta nagC$  derivatives and the complemented mutant grown as biofilm in LB media. NAG was also supplemented at a concentration of 1mM in media used for WT strain. Results are

shown as the ratio of copy number of *fimA* transcript / copy numbers of *tufA* transcript. (B) Production of type 1 fimbriae was also evaluated for each strain by mannose specific agglutination to the yeast *S. cerevisiae*. LB medium was used in the experiments and NAG was supplemented at a concentration of 1 mM when needed. Results are the mean values and standard error of 3 biological experiments. Statistical analyzes were made using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

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



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

<b>Strains</b>	<b>Characteristics</b>	<b>Origin</b>	<b>Disease</b>	<b>References</b>
LF82	Wild type AIEC O83:H1 Amp <sup>R</sup>	Human	Crohn's disease	[4]
LF82Δ <i>nagC</i>	LF82 Δ <i>nagC</i> Amp <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>			This study
MG1655	Laboratory <i>E. coli</i> K-12	Human	Healthy	[47]
EDL933	Wild type EHEC O157:H7	Human	Diarrhea, HUS	[48]
17.2	Wild type EAEC	Human	Diarrhea	[49]
NC101	Wild type Commensal (AIEC-like)	Mouse	Mouse colitis	[50]
χ7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 glnV44 fhuA21 lacY1 recA1 RP4-2-Tc::Mu λpir ΔasdA4 Δzhf-2::Tn10</i>			[51]
<b>Plasmids</b>	<b>Characteristics</b>			<b>References</b>
pGEM <sup>®</sup> -T	Cloning vector			Promega Corp., Madison, WI, USA
pMEG-375	Suicide vector sacRB mobRP4 oriR6K; Cm <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>			Roy Curtiss III, Arizona State University, Tempe, AZ, USA
pΔ <i>nagC</i>	pMEG-375 with Δ <i>nagC</i> :: Km <sup>R</sup>			[16]
pTrc99a	expression vector with IPTG inducible lacI promoter; Ap <sup>R</sup>			[52]
p <i>nagC</i>	pTrc99a with <i>nagC</i>			[16]
p <i>nagC</i> -JFS	p <i>nagC</i> with Cp <sup>R</sup>			This study

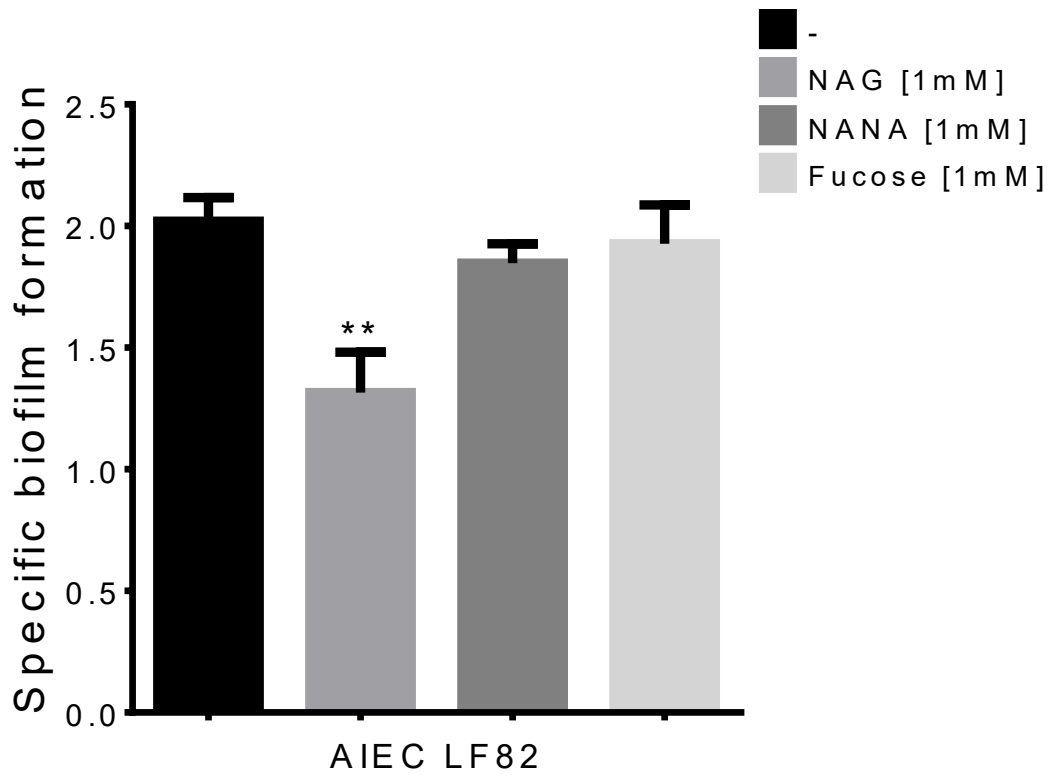


Figure 1.

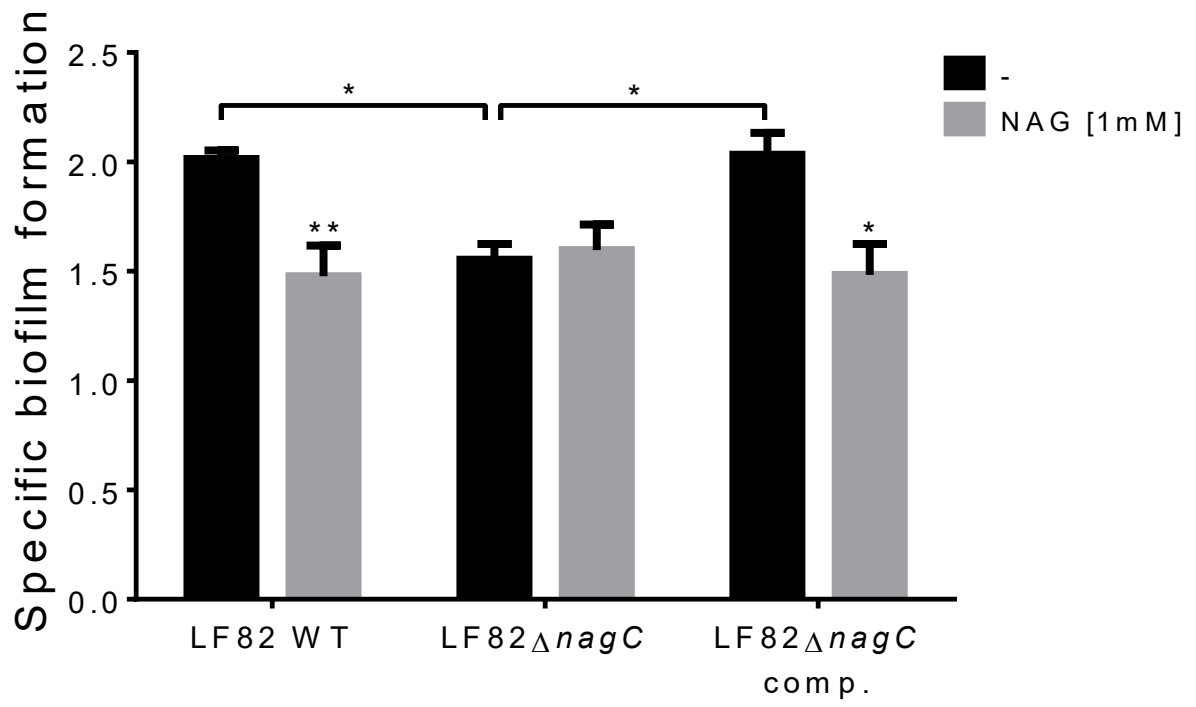
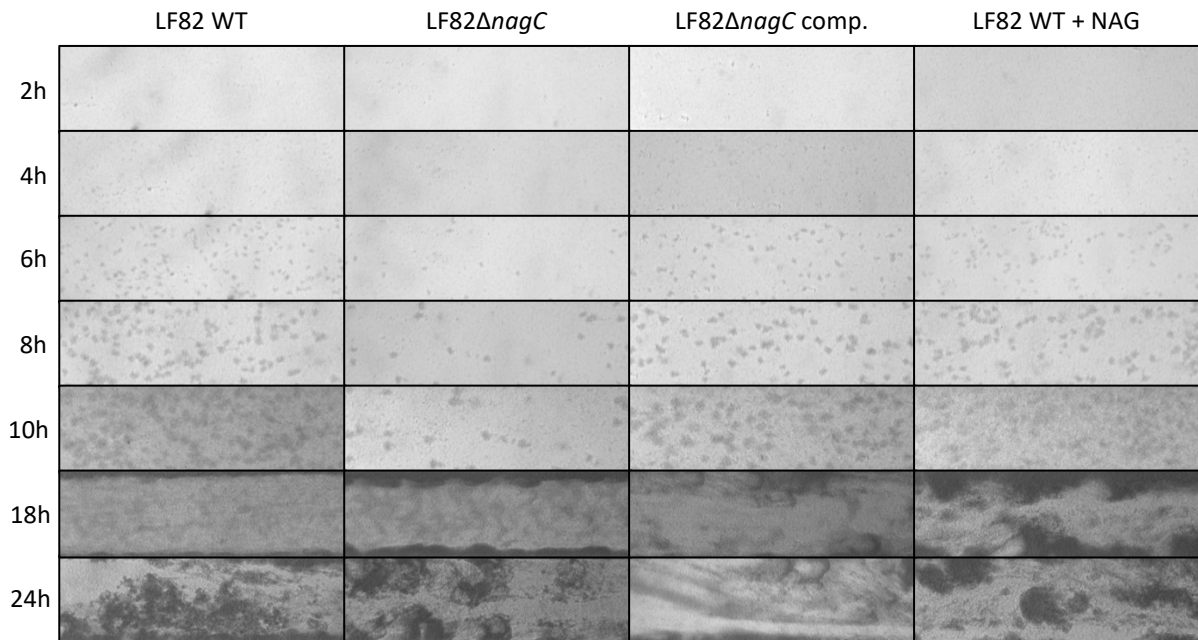
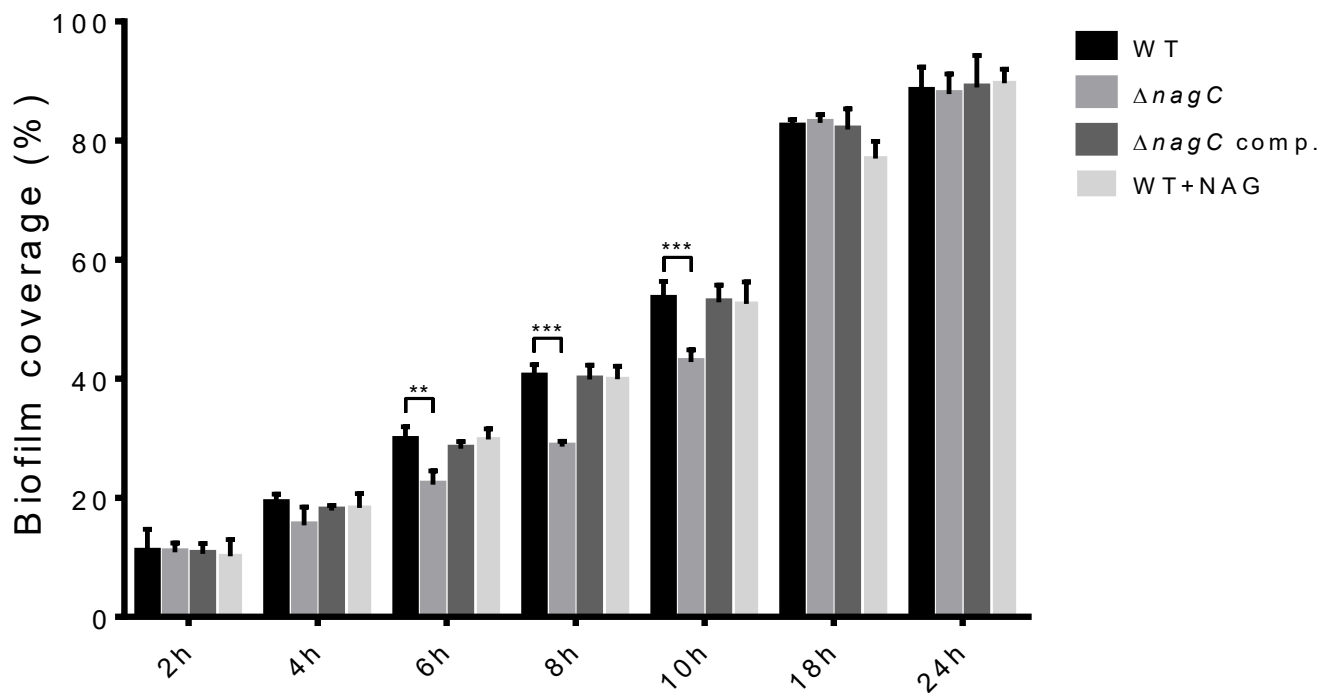
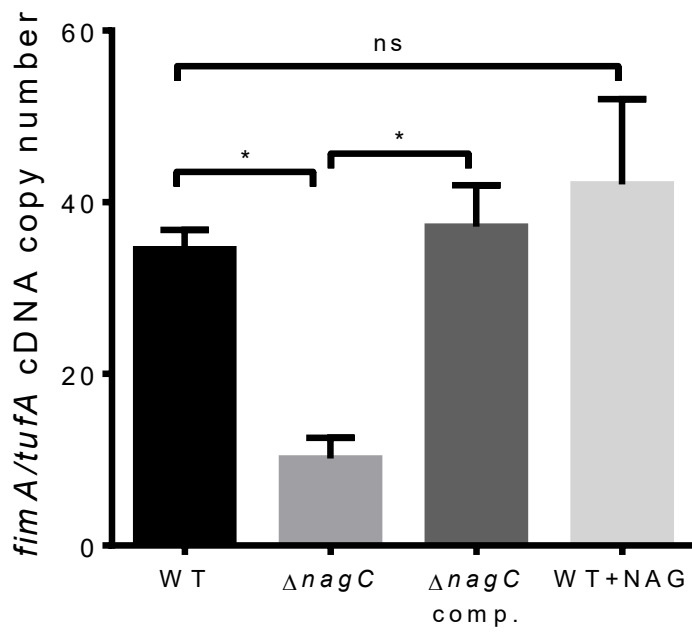


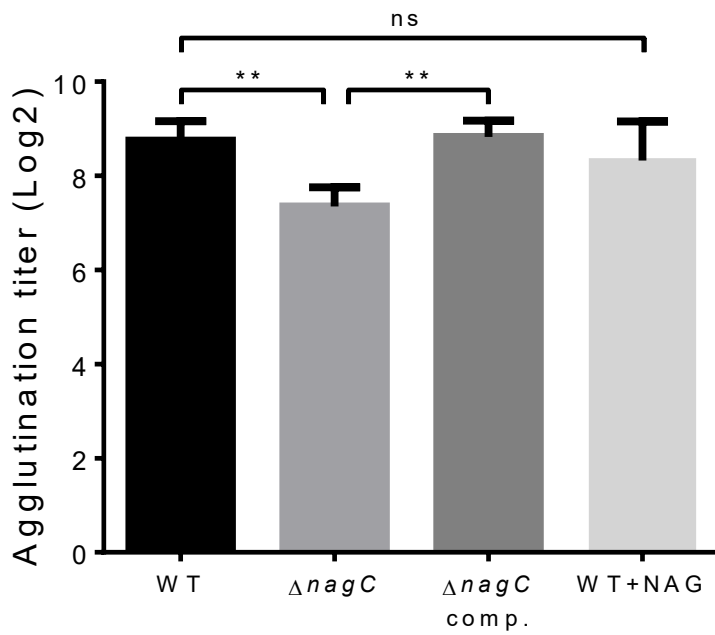
Figure 2.

**A****B****Figure 3.**

**A**



**B**



**Figure 4.**

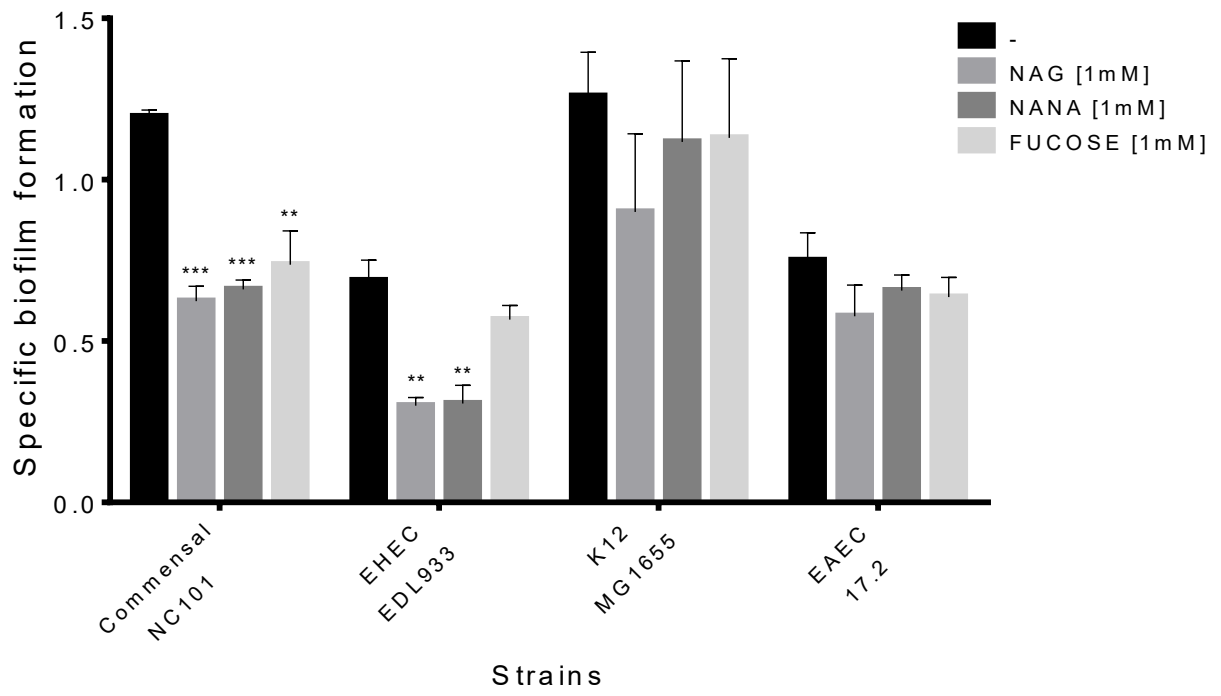


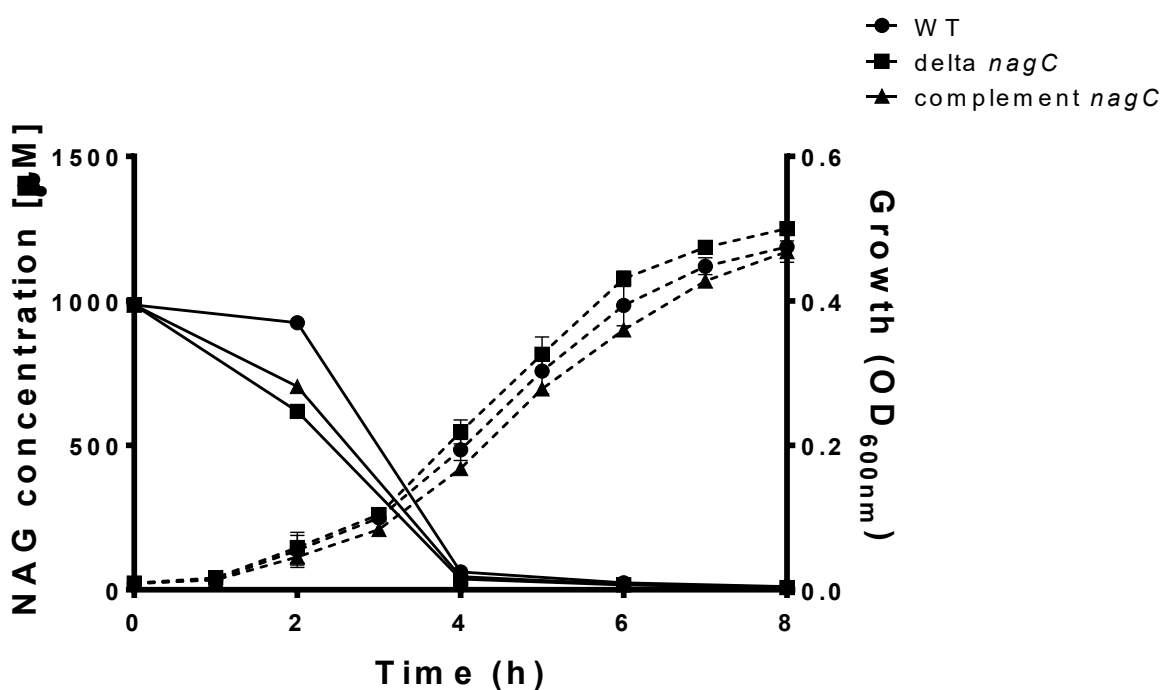
Figure 5.

**Additional Files:****Table S1. List of primers used in this study**

<b>Names</b>	<b>Sequence 5' → 3'</b>	<b>Use</b>
M- <i>tufA</i> -For	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	Standard curve
M- <i>tufA</i> -Rev	GAAGAAGTTGAAATCGTTGG	Standard curve
q- <i>tufA</i> -For	GTGAAGAAATCGAACGTG	qRT-PCR
q- <i>tufA</i> -Rev	TTC AATGGTACCAGTCAC	qRT-PCR
M- <i>fimA</i> -For	CTCTGTCCCTGAGTTCTACA	Standard curve
M- <i>fimA</i> -Rev	ATTAGCAGCACCTGGGGTTG	Standard curve
q- <i>fimA</i> -For	GGCTCTGTTGATCAAACCGT	qRT-PCR
q- <i>fimA</i> -Rev	CCGCAGCTGAACTCTGTAGA	qRT-PCR
<i>nagC</i> -aval-For	ACTTTCTTTATTGAGTTACGACCTCGTTA	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -amont-Rev	TGTGCTTTTATAGTGGCGCTTATTGTTGTC	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>AscI</i> - <i>nagC</i> -For	AGGCGCGCTACCGCGCCCGTGGGTGTCCG	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>SacI</i> - <i>nagC</i> -Rev	CGAGCTCGGCGATGCCGTATATTACCGG	Construction of <i>nagC</i> mutant
H2P2- <i>nagC</i> -For	AGCGCCACTATAAAAGCACAtgtaggctggagctgcttcg	Construction of <i>nagC</i> mutant
H1P1- <i>nagC</i> -Rev	GTA ACTCAATAAGAGAAAGTattccgggatccgtcgacc	Construction of <i>nagC</i> mutant
<i>nagC</i> -comp-For- <i>SacI</i>	CGAGCTCGTAACGAGGTCGTA ACTCAAT	<i>nagC</i> mutant complementation
<i>nagC</i> -comp-Rev-BamHI	CGGGATCCCGGCGCCACTATAAAAGCACAT	<i>nagC</i> mutant complementation

## Mass Spectrometry

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



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





Figure S2. NagC consensus DNA binding site generated by Weblogo from known NagC binding sequences [13, 16, 41, 42].

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

```

LF82      AAGTGATGTTTGCCATAGATTGCGAGATGCCCTGTCTCATTGACTATCGCGGTGCACCTT
|
MG1655    AAGTGATGTTTGCCATAGATTGCGAGATGCCCTGTCTCATTGACTATCTTGGTGCACCTT

LF82      TATACCTGTTTATACCAGATCAAAAATCACGCAATCCATACAACAAAACGAGATTTGCAAT
|
MG1655    TATACCTGTTTATACCAGATCAAAAATCACGCAATCCATACAACAAAACCAGATTTGCAAT

LF82      TCGTGTCACAAAATATGTCGATCTTTTTCTAAGAGGAAGATGCCATGTGAAGCCAGACGA
|
MG1655    TCGTGTCACAAAATATGTCGATCTTTTTCTAAGAGGAAGATGCCATGTGAAGCCAGACGA

LF82      ACACCTGCGGTGGTCTTCAAAAATAAAGGCATTCTTTTAACTATTTGTTTTATAAATGA
|
MG1655    ACACCTGCGGTGGTCTTCAAAAATAAAGATCTTAGTTTAACTATTTGTTTTATAAATAA

LF82      TTTATTTGGGGTCTAAACAAGGGAAGCTTTGCAAGCTAGCTCAGTGAGCGTGGTGAAAAT
|
MG1655    TTTATTAAGAGTCTAAACAAGGGGAGCTTTGCAAGCTAACTCAGTGAGCTTGGTGAAAAT

LF82      AAGTGTTTACCCGCCATCAGGCTGATCATAATTCTCATCATGAAATATGTTTCCTGGTTT
|
MG1655    CAGTGTTTACCCGCCATCAGGCTGAGCATAATTCTCATCATGAAATATGTTTCCTGGTTT

LF82      TTGGCTTGTAAGTGGTCACCCCTGAAGTCGATCTGGAAAGGCTTGATAGATGTTGGTGTTT
|
MG1655    GTGGCTTGTAAGTGGTCACTTCTGAAGTCGATCTGGAGAGGCTTGTTGATGTTGGTGTTT

```

## **DISCUSSION**

### **L'influence des sucres dérivés du mucus sur la formation de biofilm de LF82.**

Dans l'environnement intestinal, la présence des sucres dérivés du mucus peut influencer le comportement des *E. coli*. Leur disponibilité et les préférences d'utilisation métabolique des bactéries affectent la colonisation des *E. coli* au sein des différentes niches écologiques présentes dans le colon ou dans le petit intestin (Conway and Cohen, 2015). En plus d'utiliser ces sucres comme source de carbone, les *E. coli* les utilisent également comme signaux chimiques pouvant influencer leur expression génique. Ainsi, le NAG et le NANA influencent la virulence des EHEC et la production d'adhésine chez les K-12 via le régulateur transcriptionnel NagC (Le Bihan et al., 2017; Sicard et al., 2017). Il est possible que certains *E. coli* forment des biofilms dans l'environnement intestinal bien qu'aucune observation directe n'ait été faite *in situ* (Rossi et al., 2017). Les sucres dérivés du mucus pourraient donc affecter la formation de biofilm des *E. coli* au niveau intestinal via un mécanisme semblable. Il existe d'ailleurs une corrélation entre la présence de biofilms intestinaux et les IBD (Swidsinski et al., 2005b). Les AIEC, en plus d'être impliqués dans ces maladies, sont également de fortes productrices de biofilm. Comme le mucus des personnes atteintes d'IBD est altéré et possède une plus faible proportion de mucine, il est possible que la concentration en NAG y soit également réduite. Ceci pourrait favoriser la colonisation de LF82 sous forme de biofilm. En effet, l'inactivation de NagC réduit la formation de biofilm de LF82 que ce soit via le métabolisme du NAG ou par mutation ciblée du gène *nagC*. NagC semble donc être un régulateur positif de la formation des biofilms et les gènes qu'il régule, directement ou indirectement, ne sont pas connus chez la souche LF82.

### **NagC est impliqué dans les étapes précoces de la formation du biofilm de LF82.**

La formation de biofilm en micro-fluidique avec l'appareil BioFlux offre des conditions de cultures différentes qu'en plaque à 96 puits. D'abord, le milieu de culture est dynamique et le biofilm se forme donc en présence d'une force de cisaillement ce qui ajoute un élément physiologique intéressant, étant comparable au mouvement du bol digestif. De plus, le milieu de culture est constamment renouvelé et donc toujours frais. Il n'y a donc pas d'accumulation de déchets toxiques ni d'épuisement du milieu lors de ce mode de culture.

L'appareil BioFlux est également couplé à un microscope optique, permettant la visualisation du processus de formation de biofilm à travers le temps. On peut alors voir les bactéries adhérer à la surface, se multiplier, former des microcolonies et éventuellement produire une matrice polymérique et un biofilm mature. Cette observation en temps réel des différentes étapes a permis d'identifier ce qui semble être un défaut d'adhésion chez le mutant LF82 $\Delta$ nagC. Ainsi, un nombre restreint de bactéries semblent avoir adhérées à la surface lors de la croissance en présence du flux continu, ce qui se traduit par l'apparition d'une plus faible quantité de microcolonies. Le traitement des images obtenues par microscopie avec le logiciel ImageJ nous a permis de quantifier l'abondance de biofilm présent sur ces images. Des différences significatives étaient observées en comparant la souche mutante à la souche sauvage ou à la souche complémentée entre 6h et 10h après l'adhésion. Les biofilms des 3 souches étaient comparables après 18h ce qui suggère une implication de NagC lors des étapes précoces de la formation de biofilm, probablement lors de l'adhésion à la surface et/ou lors de l'adhésion entre cellules. Il faut noter que l'ajout du NAG n'a pas eu d'effet sur la formation de biofilm de LF82 en microfluidique. LF82 consomme le NAG très rapidement (4 heures après l'ajout) et presque entièrement lors de la formation de biofilm en statique. Toutefois, en microfluidique, le milieu étant riche et constamment renouvelé, il est possible que la cinétique d'utilisation du NAG soit modifiée et que le mécanisme de répression du régulateur NagC par le NAG-6-P en soit altéré.

### **L'influence de NagC sur les fimbriae de type 1 chez LF82.**

Les fimbriae de type 1 participent à la virulence de la souche LF82 (Dreux et al., 2013) et sont impliqués dans sa formation de biofilm (Nickerson and McDonald, 2012). Il a été démontré que chez *E. coli* K-12, NagC peut lier deux sites en amont de *fimB* et ainsi activer l'expression de la recombinase FimB. FimB est responsable de la variation de phase des fimbriae sous leur forme active. L'expression des fimbriae de type 1, telle que mesurée par qRT-PCR, ainsi que leur production, mesurée par agglutination mannose-dépendante à la levure, est diminuée significativement chez le mutant *nagC*. Ces résultats suggèrent donc la présence d'un mécanisme de régulation d'expression des fimbriae par NagC chez la souche AIEC semblable

à celui décrit chez *E. coli* K-12 (Sohanpal et al., 2004). De plus, en se basant sur la littérature (Plumbridge, 1995; Sohanpal et al., 2004; El Qaidi et al., 2009; Le Bihan et al., 2017) et sur la base de données Genbank, nous avons généré une séquence consensus à partir de différentes séquences reconnues par NagC (**Figure S2**). Cette séquence fut utilisée afin de prédire des potentiels sites d'adhésion de NagC dans le génome de LF82 à l'aide du programme FIMO. Deux séquences ont été identifiées à des positions identiques que chez *E. coli* K-12, soit 5'TGCAATTCGTGTCACAAAATATG3' et 5'CATATTTTCATGATGAGAATTATG3'. Elles se retrouvent en amont de *fimB* et serviraient de sites de liaison potentielle à NagC. Ainsi, le métabolisme du NAG qui mène à la production de NAG-6-P et subséquentement à l'inactivation de NagC pourrait provoquer une diminution de l'expression de fimbriae de type 1. Ceci contribuerait à la réduction de la formation de biofilm de LF82. Le métabolisme du NAG a également été lié à une réduction de la production de curli chez les *E. coli* K-12 (Barnhart et al., 2006). Toutefois, ce défaut de production de curli ne semble pas impliquer une régulation directe par NagC. Chez la souche LF82 $\Delta$ *nagC*, le morphotype sur agar contenant du Congo Red n'était pas différent de celui de la souche WT et aucune différence ne fut observée par qRT-PCR sur l'expression des gènes *csg* (données non présentées).

### **Les sucres dérivés du mucus affectent la formation de biofilm de souches provenant de différents pathotypes d'*E. coli*.**

Un criblage de souches provenant de différents pathotypes d'*E. coli* a été effectué en plaque 96 puits afin de déterminer leurs conditions optimales de formation de biofilm en statique. Une grande variabilité était observée parmi les souches en fonction des conditions de culture telle que la richesse du milieu, la présence de NaCl et la température d'incubation. Ceci démontre l'importante influence des facteurs environnementaux lors du processus de formation de biofilm. Les conditions utilisées pour les différentes souches étaient sélectionnées en fonction de l'intensité et de la reproductibilité des biofilms formés. Ainsi, EDL933 forme des biofilms en milieu minimal, mais en est incapable en milieu riche. La souche NC101, quant à elle, forme peu de biofilm en milieu riche lorsqu'il y a présence de NaCl. Les autres souches testées formaient davantage de biofilm en milieu riche contenant le

NaCl. Ces résultats illustrent la grande variabilité génétique et métabolique au sein de cette espèce bactérienne (Conway and Cohen, 2015) ainsi que la complexité du processus de formation de biofilm qui implique une multitude de facteurs (Reisner et al., 2006).

La présence des trois sucres testés (NAG, NANA et fucose) peut influencer la formation de biofilms de certaines souches et ne pas avoir d'impact chez d'autres. Lors de la formation de biofilm des *E. coli*, les facteurs participant à ce processus varient non seulement entre les pathotypes, mais également entre les souches d'un même pathotype. Ainsi, pour s'établir sous forme de biofilm, les *E. coli* doivent exprimer des adhésines favorisant l'adhésion à une surface et l'adhésion entre cellules en plus de produire une matrice polymérique. Généralement, l'attachement initial à une surface s'effectue par l'entremise des flagelles. Chez la plupart des *E. coli* commensales, la présence de flagelle est essentielle à la formation de biofilm (Pratt and Kolter, 1998a; Wood et al., 2006). Toutefois, chez les EAEC, la présence de flagelle n'est pas essentielle (Sheikh et al., 2001), alors que l'expression de curli est suffisante pour permettre l'initiation de la formation du biofilm (Prigent-Combaret et al., 2000). Les EAEC peuvent coloniser le petit et le gros intestin en adhérant aux cellules épithéliales. Elles y forment un agrégat de cellules semblable aux biofilms par l'entremise des fimbriae d'adhérence agrégative (AAF) caractéristiques du pathotype (Estrada-Garcia and Navarro-Garcia, 2012). Par ailleurs, les EHEC, les EPEC et les ETEC expriment préférentiellement les curli à température ambiante tandis que plusieurs ExPEC les expriment également à 37°C illustrant une fois de plus l'hétérogénéité du processus de formation de biofilm entre les différents pathotypes (Rossi et al., 2017). Les fimbriae de type 1 forment un autre groupe d'adhésines importantes pour la formation de biofilm. Ils sont présents chez la majorité des *E. coli*, mais absents des EHEC O157:H7 suite à une déplétion dans la région régulatrice de *fim* (Vogeleer et al., 2014). Ainsi, l'effet du NAG sur la formation de biofilm de la souche EDL933 n'est pas attribuable à ce type de fimbriae. Toutefois, l'inactivation de NagC suite à l'ajout du NAG pourrait tout de même expliquer la diminution observée. En effet, l'inactivation de NagC affecte la production de SST3 (Le Bihan et al., 2017) ce qui pourrait avoir une incidence sur la formation de biofilm de la souche. EspA est une

composante des SST3 et joue un rôle important dans la formation de biofilm des EHEC (Vikram et al., 2010; Yu et al., 2011; Sharma et al., 2016b).

### **L'utilisation du NAG comme potentiel anti-inflammatoire.**

La glucosamine est une molécule naturellement produite par le corps humain qui se retrouve dans plusieurs glycoprotéines, glycolipides et glycosaminoglycanes. Elle et ses dérivés, incluant le NAG, sont depuis longtemps reconnus en médecine pour leur propriété anti-inflammatoire. Elle peut, entre autres, être utilisée pour ses effets anticancérigènes (Zahedipour et al., 2017) et est également utilisée comme traitement contre l'arthrose (Reginster et al., 2012).

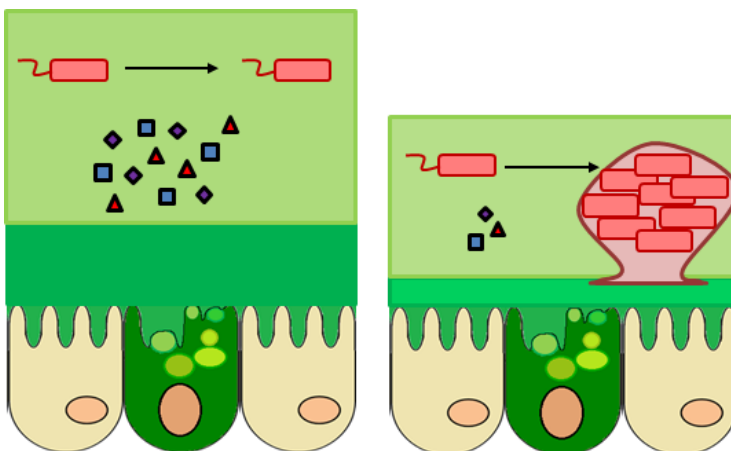
Certaines études suggèrent son utilisation potentielle lors de traitement des maladies inflammatoires intestinales. Ainsi, lors de colite induite au dextran de sulfate de sodium (DSS) chez le rat, l'administration orale de glucosamine réduit l'inflammation au niveau du colon en plus de réduire les dommages histopathologiques causés par le DSS (Yomogida et al., 2008). D'autres études semblables, effectuées chez la souris, démontrent des résultats similaires. L'administration de sulfate de glucosamine ou d'oligomères de glucosamine provoque une diminution de l'inflammation et de dommage histologique lors de colite induite au DSS. Cette diminution de l'inflammation est le résultat d'une baisse de l'expression de cytokines pro-inflammatoires tel que le facteur de nécrose tumoral  $\alpha$  perceptible au niveau du colon, mais également dans le sérum des souris traitées (Bak et al., 2014; Azuma et al., 2015). Cette réduction de l'expression de cytokines semble être associée à une baisse de production du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) par les cellules du colon. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription contrôlant plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation et serait également impliqué dans la pathogenèse des IBD en favorisant la production de cytokine pro-inflammatoire (Ardite et al., 1998).

Une étude comparable a également été effectuée chez de jeunes patients atteints de maladies inflammatoires intestinales résistantes aux traitements conventionnels. Ces patients étaient alors traités par des doses quotidiennes de NAG, via une administration orale ou rectale en fonction de la localisation de l'inflammation. Une variation dans

l'efficacité du traitement fut observée, variant d'aucun effet chez certains patients à une rémission complète chez d'autres. Une amélioration de l'état de la maladie était tout de même constatée chez la majorité des patients (Salvatore et al., 2000). Une analyse histochimique faite à partir de biopsie a démontré une augmentation de la quantité de glycosaminoglycanes, incluant le NAG, présent au niveau de la muqueuse intestinale. Il semblerait donc que le traitement ait un impact positif sur la production de mucus.

### Conclusion.

La présence de biofilm au niveau intestinal d'individus sains demeure incertaine à ce jour bien qu'ils aient été observés chez des patients atteints de IBD. Les *E. coli* colonisent la muqueuse intestinale des vertébrés et il serait possible qu'elles forment des biofilms au sein du mucus intestinal. Il a été démontré que des facteurs présents dans l'environnement intestinal, tels que les anticorps IgA et les mucines, peuvent influencer la formation de biofilm des *E. coli*. Nous démontrons ici que des sucres dérivés du mucus peuvent diminuer la formation de biofilm de souches provenant de différents pathotypes. Des monosaccharides comme le NAG, en plus d'être consommée par les *E. coli*, servent de signaux modulateurs, illustrant le lien présent entre le métabolisme, l'expression génique et la pathogénèse chez ces bactéries. Ainsi, un déséquilibre de la flore intestinale et/ou une altération de la couche de mucus pourraient causer une baisse de la concentration des sucres se traduisant par une formation de biofilm accrue des *E. coli* (**Figure 7**).



**Figure 7: Modèle de prévention de la formation de biofilm au niveau intestinal.** L'intégrité de la muqueuse ainsi que l'activité du microbiote offrirait aux *E. coli* une niche peu propice à la formation de biofilm en partie grâce aux sucres dérivés du mucus tel que le NAG.  $\Delta\Diamond$  : Sucres dérivés du mucus.



L'effet du NAG sur le biofilm se produit par l'inactivation du régulateur NagC chez la souche AIEC LF82. Une mutation du gène *nagC* chez cette souche provoque un défaut d'adhésion lors de la formation de biofilm en microfluidique. Cette réduction de l'adhésion est en partie due à une baisse de production des fimbriae de type 1, qui jouent un rôle important dans la formation de biofilm de cette souche. Le mécanisme exact par lequel NagC réduit la formation de biofilm implique probablement d'autres facteurs qui devront être caractérisés.

### **Perspectives.**

L'étude a permis l'identification et la caractérisation de certaines stratégies utilisées par le microbiote pour inhiber la formation de biofilm, ou du moins, l'adhésion des *E. coli* via leur métabolisme. La majorité des *E. coli* consomme le NAG et sa présence dans l'environnement intestinal pourrait donc favoriser leur croissance tout en réduisant leur virulence. L'utilisation de NAG comme supplément est tout de même discutable, entre autres puisque sa présence est liée à la production de facteurs de virulence chez d'autres pathogènes tels que *Streptococcus mutans* et *Pseudomonas aeruginosa* (Naseem and Konopka, 2015). Les bactéries mucolytiques présentes dans le microbiote participent également au relâchement de NAG dans l'environnement intestinal. Plusieurs bactéries telles que *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium* spp. et *Ruminococcus* spp. possèdent ce potentiel mucolytique. Elles produisent des enzymes tels que des glycosidases, des sulfatases et des sialidases, leur permettant de libérer des sucres du mucus (Gibold et al., 2016; Sicard et al., 2017). Les *E. coli* peuvent s'associer à certaines de ces bactéries et profiter de leur activité mucolytique (Conway and Cohen, 2015). L'utilisation de bactéries mucolytiques comme potentiel souches probiotiques demeure peu probable. Ces souches peuvent libérer plusieurs types de sucres incluant l'acide sialique dont le catabolisme par certaines *E. coli* favorise l'inflammation au niveau intestinal de souris avec colite induite au DSS (Huang et al., 2015). Des souches probiotiques d'*E. coli* telle que Nissle 1917 possèdent un potentiel intéressant dans le traitement des IBD (Vejborg et al., 2011; Michielan and D'Inca, 2015). Nissle 1917 colonise des niches semblables aux autres *E. coli*, mais ne consomme pas le NAG, le laissant disponible pour les autres souches (Maltby et al., 2013).

Elle surclasse également plusieurs autres souches d'*E. coli* lors de la formation de biofilm (Hancock et al., 2010). De plus, elle réduit la capacité invasive de la souche AIEC LF82 tout en modulant la production de cytokines pro-inflammatoires des cellules intestinales (Huebner et al., 2011). Ces nouvelles connaissances permettront de mieux cibler le développement de stratégies novatrices et efficaces afin de contrer la colonisation et les infections causées par différentes *E. coli* pathogènes intestinales.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abraham, J.M., Freitag, C.S., Clements, J.R., and Eisenstein, B.I. (1985). An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(17), 5724-5727.
- Agladze, K., Wang, X., and Romeo, T. (2005). Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol* 187(24), 8237-8246. doi: 10.1128/jb.187.24.8237-8246.2005.
- Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E., and Barnich, N. (2014). Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int* 2014, 567929. doi: 10.1155/2014/567929.
- Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22(1), 3-6. doi: 10.1093/bioinformatics/bti739.
- Ardite, E., Panes, J., Miranda, M., Salas, A., Elizalde, J.I., Sans, M., et al. (1998). Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 124(3), 431-433. doi: 10.1038/sj.bjp.0701887.
- Azuma, K., Osaki, T., Kurozumi, S., Kiyose, M., Tsuka, T., Murahata, Y., et al. (2015). Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Carbohydr Polym* 115, 448-456. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.012.
- Bak, Y.K., Lampe, J.W., and Sung, M.K. (2014). Effects of dietary supplementation of glucosamine sulfate on intestinal inflammation in a mouse model of experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 29(5), 957-963. doi: 10.1111/jgh.12485.
- Barnhart, M.M., and Chapman, M.R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60, 131-147. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142106.
- Barnhart, M.M., Lynem, J., and Chapman, M.R. (2006). GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188(14), 5212-5219. doi: 10.1128/jb.00234-06.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional cooperation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 48(3), 781-794.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117(6), 1566-1574. doi: 10.1172/jci30504.
- Beloin, C., Roux, A., and Ghigo, J.M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289.
- Ben Nasr, A., Olsen, A., Sjobring, U., Muller-Esterl, W., and Bjorck, L. (1996). Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 20(5), 927-935.
- Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., de la Foye, A., Harel, J., et al. (2013). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 15(2), 610-622. doi: 10.1111/1462-2920.12019.
- Blomberg, L., Krivan, H.C., Cohen, P.S., and Conway, P.L. (1993). Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. *Infect Immun* 61(6), 2526-2531.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., and Siezen, R.J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* 152(Pt 1), 273-280. doi: 10.1099/mic.0.28415-0.

- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67(9), 4499-4509.
- Branchu, P., Matrat, S., Vareille, M., Garrivier, A., Durand, A., Crepin, S., et al. (2014). NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog* 10(1), e1003874. doi: 10.1371/journal.ppat.1003874.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., and Owen, L.J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 26, 26191. doi: 10.3402/mehd.v26.26191.
- Carlson-Banning, K.M., and Sperandio, V. (2016). Catabolite and Oxygen Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence. *MBio* 7(6). doi: 10.1128/mBio.01852-16.
- Chang, D.E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., et al. (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19), 7427-7432. doi: 10.1073/pnas.0307888101.
- Chapman-Kiddell, C.A., Davies, P.S., Gillen, L., and Radford-Smith, G.L. (2010). Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 16(1), 137-151. doi: 10.1002/ibd.20968.
- Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). The sigmaE pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195(1), 76-84. doi: 10.1128/jb.01079-12.
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ Microbiol* 15(2), 355-371. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02824.x.
- Chassaing, B., Garenaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guerardel, Y., Barnich, N., et al. (2015). Analysis of the sigmaE Regulon in Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli* Revealed Involvement of the waaWVL Operon in Biofilm Formation. *J Bacteriol* 197(8), 1451-1465. doi: 10.1128/JB.02499-14.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallee, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., et al. (2011). Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest* 121(3), 966-975. doi: 10.1172/jci44632.
- Chauhan, A., Sakamoto, C., Ghigo, J.M., and Beloin, C. (2013). Did I pick the right colony? Pitfalls in the study of regulation of the phase variable antigen 43 adhesin. *PLoS One* 8(9), e73568. doi: 10.1371/journal.pone.0073568.
- Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29(1), 83-98. doi: 10.1016/j.femsre.2004.07.002.
- Cieza, R.J., Hu, J., Ross, B.N., Sbrana, E., and Torres, A.G. (2015). The IbeA Invasin of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Mediates Interaction with Intestinal Epithelia and Macrophages. *Infect Immun* 83(5), 1904-1918. doi: 10.1128/IAI.03003-14.
- Cimdins, A., Simm, R., Li, F., Luthje, P., Thorell, K., Sjolting, A., et al. (2017). Alterations of c-di-GMP turnover proteins modulate semi-constitutive rdar biofilm formation in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*. doi: 10.1002/mbo3.508.
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* 282(46), 33275-33283. doi: 10.1074/jbc.M702800200.

- Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005). Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(6), G1105-1109. doi: 10.1152/ajpgi.00572.2004.
- Conway, T., and Cohen, P.S. (2015). Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
- Cornick, S., Tawiah, A., and Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3(1-2), e982426. doi: 10.4161/21688370.2014.982426.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., et al. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1), 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., and Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 37(2), 424-432.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., et al. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127(2), 412-421.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., et al. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115(6), 1405-1413.
- de Vos, W.M. (2015). Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes* 1, 15005. doi: 10.1038/npjbiofilms.2015.5.
- Derrien, M., van Passel, M.W., van de Bovenkamp, J.H., Schipper, R.G., de Vos, W.M., and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1(4), 254-268. doi: 10.4161/gmic.1.4.12778.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T.K. (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol* 9(2), 332-346. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01143.x.
- Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Kondratiuk, R.B. (2013). Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013, 431231. doi: 10.1155/2013/431231.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., et al. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog* 9(1), e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141.
- Duguid, J.P., and Anderson, E.S. (1967). Terminology of bacterial fimbriae, or pili, and their types. *Nature* 215(5096), 89-90.
- Dunne, K.A., Chaudhuri, R.R., Rossiter, A.E., Beriotto, I., Browning, D.F., Squire, D., et al. (2017). Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original *Escherichia coli* strain. *Microb Genom* 3(3), mgen000106. doi: 10.1099/mgen.0.000106.
- El Qaidi, S., Allemand, F., Oberto, J., and Plumbridge, J. (2009). Repression of galP, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism. *Mol Microbiol* 71(1), 146-157. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06515.x.
- Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Giron, J.A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189(20), 7426-7435. doi: 10.1128/jb.00464-07.

- Estrada-Garcia, T., and Navarro-Garcia, F. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66(3), 281-298. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x.
- Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., et al. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 76(3), 1143-1152. doi: 10.1128/IAI.01386-07.
- Farfan, M.J., and Torres, A.G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 80(3), 903-913. doi: 10.1128/iai.05907-11.
- Forstner, G. (1995). Signal transduction, packaging and secretion of mucins. *Annu Rev Physiol* 57, 585-605. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003101.
- Freter, R., Brickner, H., Fekete, J., Vickerman, M.M., and Carey, K.E. (1983). Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* 39(2), 686-703.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hebraud, M., Moretro, T., Langsrud, S., et al. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* 6, 841. doi: 10.3389/fmicb.2015.00841.
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., et al. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 18(5), 617-631. doi: 10.1111/cmi.12539.
- Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 69(9), 5529-5537.
- Gonzalez Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E., and Wood, T.K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 188(1), 305-316. doi: 10.1128/jb.188.1.305-316.2006.
- Hall, M.R., McGillicuddy, E., and Kaplan, L.J. (2014). Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. *Surg Infect (Larchmt)* 15(1), 1-7. doi: 10.1089/sur.2012.129.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., and Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 18(4), 661-670.
- Hancock, V., Dahl, M., and Klemm, P. (2010). Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation. *J Med Microbiol* 59(Pt 4), 392-399. doi: 10.1099/jmm.0.008672-0.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., and Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69(8), 4474-4481.
- Hansson, G.C., and Johansson, M.E. (2010). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1(1), 51-54. doi: 10.4161/gmic.1.1.10470.
- Hasman, H., Chakraborty, T., and Klemm, P. (1999). Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol* 181(16), 4834-4841.
- Hasman, H., Schembri, M.A., and Klemm, P. (2000). Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 182(4), 1089-1095.
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., et al. (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 5(3), e54. doi: 10.1371/journal.pmed.0050054.
- Henderson, I.R., Meehan, M., and Owen, P. (1997). A novel regulatory mechanism for a novel phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 412, 349-355.

- Hernandez-Doria, J.D., and Sperandio, V. (2013). Nutrient and chemical sensing by intestinal pathogens. *Microbes Infect* 15(12), 759-764. doi: 10.1016/j.micinf.2013.06.013.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C.E., and Stanley-Wall, N.R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*. doi: 10.1093/femsre/fuv015.
- Homeier, T., Semmler, T., Wieler, L.H., and Ewers, C. (2010). The GimA locus of extraintestinal pathogenic *E. coli*: does reductive evolution correlate with habitat and pathotype? *PLoS One* 5(5), e10877. doi: 10.1371/journal.pone.0010877.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519), 1115-1118.
- Hoskins, L.C., Agustines, M., McKee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M., and Niedermeyer, G. (1985). Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75(3), 944-953. doi: 10.1172/jci111795.
- Hosoi, T., and Ozawa, K. (2009). Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)* 118(1), 19-29. doi: 10.1042/cs20080680.
- Huang, Y.L., Chassard, C., Hausmann, M., von Itzstein, M., and Hennet, T. (2015). Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nat Commun* 6, 8141. doi: 10.1038/ncomms9141.
- Huebner, C., Ding, Y., Petermann, I., Knapp, C., and Ferguson, L.R. (2011). The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated *E. coli* LF82. *Appl Environ Microbiol* 77(7), 2541-2544. doi: 10.1128/aem.01601-10.
- Jacques, M., Aragon, V., and Tremblay, Y.D. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 11(2), 97-121. doi: 10.1017/s1466252310000149.
- Jager, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg* 398(1), 1-12. doi: 10.1007/s00423-012-1030-9.
- Johansson, M.E., Larsson, J.M., and Hansson, G.C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4659-4665. doi: 10.1073/pnas.1006451107.
- Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39), 15064-15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105.
- Johansson, M.E., Thomsson, K.A., and Hansson, G.C. (2009). Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J Proteome Res* 8(7), 3549-3557. doi: 10.1021/pr9002504.
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., et al. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60(5), 631-637. doi: 10.1136/gut.2010.223263.
- Juge, N. (2012). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* 20(1), 30-39. doi: 10.1016/j.tim.2011.10.001.
- Kalita, A., Hu, J., and Torres, A.G. (2014). Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Opin Infect Dis* 27(5), 459-464. doi: 10.1097/qco.0000000000000092.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2), 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818.



- Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134(5), 743-756. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.021.
- Keeney, K.M., and Finlay, B.B. (2013). Microbiology: EHEC downregulates virulence in response to intestinal fucose. *Curr Biol* 23(3), R108-110. doi: 10.1016/j.cub.2012.12.027.
- Klemm, P. (1986). Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Embo j* 5(6), 1389-1393.
- Klemm, P. (1992). FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae. *Res Microbiol* 143(9), 831-838.
- Klemm, P., and Christiansen, G. (1987). Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* 208(3), 439-445.
- Klemm, P., and Christiansen, G. (1990). The fimD gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* 220(2), 334-338.
- Klemm, P., Jorgensen, B.J., van Die, I., de Ree, H., and Bergmans, H. (1985). The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Mol Gen Genet* 199(3), 410-414.
- Klemm, P., and Schembri, M. (2004). Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. *EcoSal Plus* 1(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.3.2.6.
- Konopka, J.B. (2012). N-acetylglucosamine (GlcNAc) functions in cell signaling. *Scientifica (Cairo)* 2012. doi: 10.6064/2012/489208.
- Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., and Martens, E.C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 10(5), 323-335. doi: 10.1038/nrmicro2746.
- Krogfelt, K.A., Bergmans, H., and Klemm, P. (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* 58(6), 1995-1998.
- Kyo, K., Muto, T., Nagawa, H., Lathrop, G.M., and Nakamura, Y. (2001). Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Hum Genet* 46(1), 5-20. doi: 10.1007/s100380170118.
- Kyo, K., Parkes, M., Takei, Y., Nishimori, H., Vyas, P., Satsangi, J., et al. (1999). Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3. *Hum Mol Genet* 8(2), 307-311.
- Larsson, J.M., Karlsson, H., Crespo, J.G., Johansson, M.E., Eklund, L., Sjoval, H., et al. (2011). Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 17(11), 2299-2307. doi: 10.1002/ibd.21625.
- Larsson, J.M., Karlsson, H., Sjoval, H., and Hansson, G.C. (2009). A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* 19(7), 756-766. doi: 10.1093/glycob/cwp048.
- Laverty, G., Gorman, S.P., and Gilmore, B.F. (2014). Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3(3), 596-632. doi: 10.3390/pathogens3030596.
- Le Bihan, G., Sicard, J.F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A.P., Garrivier, A., et al. (2017). The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 134. doi: 10.3389/fcimb.2017.00134.
- Le Quere, B., and Ghigo, J.M. (2009). BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* 72(3), 724-740. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06678.x.

- Lenicek, M., Duricova, D., Komarek, V., Gabrysova, B., Lukas, M., Smerhovsky, Z., et al. (2011). Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers. *Inflamm Bowel Dis* 17(6), 1322-1327. doi: 10.1002/ibd.21502.
- Li, J., Attila, C., Wang, L., Wood, T.K., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2007). Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. *J Bacteriol* 189(16), 6011-6020. doi: 10.1128/jb.00014-07.
- Licht, T.R., Christensen, B.B., Krogfelt, K.A., and Molin, S. (1999). Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* 145 ( Pt 9), 2615-2622.
- Luo, K., and Cao, S.S. (2015). Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract* 2015, 328791. doi: 10.1155/2015/328791.
- Macfarlane, S., and Dillon, J.F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 102(5), 1187-1196. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x.
- Macfarlane, S., McBain, A.J., and Macfarlane, G.T. (1997). Consequences of biofilm and sessile growth in the large intestine. *Adv Dent Res* 11(1), 59-68.
- Macfarlane, S., Woodmansey, E.J., and Macfarlane, G.T. (2005). Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 71(11), 7483-7492. doi: 10.1128/aem.71.11.7483-7492.2005.
- Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* 59, 379-405. doi: 10.1146/annurev.micro.59.050405.101230.
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M.P., Gibson, T., Cohen, P.S., and Conway, T. (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8(1), e53957. doi: 10.1371/journal.pone.0053957.
- Mankertz, J., and Schulzke, J.D. (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 23(4), 379-383. doi: 10.1097/MOG.0b013e32816aa392.
- Marcobal, A., Southwick, A.M., Earle, K.A., and Sonnenburg, J.L. (2013). A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology* 23(9), 1038-1046. doi: 10.1093/glycob/cwt040.
- Mariscotti, J.F., Quereda, J.J., Garcia-Del Portillo, F., and Pucciarelli, M.G. (2014). The *Listeria monocytogenes* LPXTG surface protein Lmo1413 is an invasin with capacity to bind mucin. *Int J Med Microbiol* 304(3-4), 393-404. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.01.003.
- Martin-Sosa, S., Martin, M.J., and Hueso, P. (2002). The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J Nutr* 132(10), 3067-3072.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C., Dahbi, G., et al. (2009a). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 15(6), 872-882. doi: 10.1002/ibd.20860.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., et al. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* 63(1), 116-124. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304119.

- Martinez-Medina, M., and Garcia-Gil, L.J. (2014). *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5(3), 213-227. doi: 10.4291/wjgp.v5.i3.213.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., et al. (2009b). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 9, 202. doi: 10.1186/1471-2180-9-202.
- McGuckin, M.A., Eri, R.D., Das, I., Lourie, R., and Florin, T.H. (2011). Intestinal secretory cell ER stress and inflammation. *Biochem Soc Trans* 39(4), 1081-1085. doi: 10.1042/bst0391081.
- McPhee, J.B., Small, C.L., Reid-Yu, S.A., Brannon, J.R., Le Moual, H., and Coombes, B.K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 82(8), 3383-3393. doi: 10.1128/iai.01888-14.
- Michielan, A., and D'Inca, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm* 2015, 628157. doi: 10.1155/2015/628157.
- Miquel, S., Peyretilade, E., Claret, L., de Vallee, A., Dossat, C., Vacherie, B., et al. (2010). Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0012714.
- Mitra, A., Palaniyandi, S., Herren, C.D., Zhu, X., and Mukhopadhyay, S. (2013). Pleiotropic roles of uvrY on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *PLoS One* 8(2), e55492. doi: 10.1371/journal.pone.0055492.
- Mizan, M.F., Jahid, I.K., and Ha, S.D. (2015). Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiol* 49, 41-55. doi: 10.1016/j.fm.2015.01.009.
- Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., et al. (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)* 84(12), 1055-1066. doi: 10.1007/s00109-006-0100-2.
- Moller, A.K., Leatham, M.P., Conway, T., Nuijten, P.J., de Haan, L.A., Krogfelt, K.A., et al. (2003). An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. *Infect Immun* 71(4), 2142-2152.
- Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 5(11), e307. doi: 10.1371/journal.pbio.0050307.
- Moons, P., Michiels, C.W., and Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* 35(3), 157-168. doi: 10.1080/10408410902809431.
- Moran, A.P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60(10), 1412-1425. doi: 10.1136/gut.2010.212704.
- Naseem, S., and Konopka, J.B. (2015). N-acetylglucosamine Regulates Virulence Properties in Microbial Pathogens. *PLoS Pathog* 11(7), e1004947. doi: 10.1371/journal.ppat.1004947.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1), 142-201.
- Nguyen, H.T., Dalmaso, G., Muller, S., Carriere, J., Seibold, F., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* Modulate Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology* 146(2), 508-519. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.021.

- Nickerson, K.P., and McDonald, C. (2012). Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin. *PLoS One* 7(12), e52132. doi: 10.1371/journal.pone.0052132.
- Nilsson, H.E., Ambort, D., Backstrom, M., Thomsson, E., Koeck, P.J., Hansson, G.C., et al. (2014). Intestinal MUC2 mucin supramolecular topology by packing and release resting on D3 domain assembly. *J Mol Biol* 426(14), 2567-2579. doi: 10.1016/j.jmb.2014.04.027.
- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C., and Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(9), 852-856. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.017.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837), 603-606.
- Old, D.C., and Duguid, J.P. (1970). Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. *J Bacteriol* 103(2), 447-456.
- Olsen, A., Jonsson, A., and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338(6217), 652-655. doi: 10.1038/338652a0.
- Olsen, P.B., and Klemm, P. (1994). Localization of promoters in the fim gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of fimB and fimE. *FEMS Microbiol Lett* 116(1), 95-100.
- Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(1), 25-38. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.001.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H., and Henderson, I. (1996). Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16(2), 63-76.
- Pacheco, A.R., Curtis, M.M., Ritchie, J.M., Munera, D., Waldor, M.K., Moreira, C.G., et al. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492(7427), 113-117. doi: 10.1038/nature11623.
- Palestrant, D., Holzkecht, Z.E., Collins, B.H., Parker, W., Miller, S.E., and Bollinger, R.R. (2004). Microbial Biofilms in the Gut: Visualization by Electron Microscopy and by Acridine Orange Staining. *Ultrastructural Pathology* 28(1), 23-27. doi: 10.1080/01913120490275196.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., et al. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39(7), 830-832. doi: 10.1038/ng2061.
- Peeters, H., Bogaert, S., Laukens, D., Rottiers, P., De Keyser, F., Darfeuille-Michaud, A., et al. (2007). CARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 in Crohn's disease. *Int J Immunogenet* 34(3), 181-191. doi: 10.1111/j.1744-313X.2007.00670.x.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G.C., Gendler, S.J., Velcich, A., Lundberg, J.O., et al. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(2), G327-333. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2010.
- Plumbridge, J. (1995). Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmUS operon and requires two separated NagC binding sites. *Embo j* 14(16), 3958-3965.
- Plumbridge, J., and Kolb, A. (1991). CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the nagE-B and manX genes of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 217(4), 661-679.
- Plumbridge, J., and Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(1), 47-54.

- Plumbridge, J.A. (1991). Repression and induction of the nag regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of nagC and nagA in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* 5(8), 2053-2062.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998a). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology* 30(2), 285-293.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998b). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30(2), 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., and Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2(4), 450-464.
- Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., et al. (1994). Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35(3), 353-359.
- Reginster, J.Y., Neuprez, A., Lecart, M.P., Sarlet, N., and Bruyere, O. (2012). Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. *Rheumatol Int* 32(10), 2959-2967. doi: 10.1007/s00296-012-2416-2.
- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., and Molin, S. (2006). In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 188(10), 3572-3581. doi: 10.1128/jb.188.10.3572-3581.2006.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M., and Wood, T.K. (2004). Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 88(5), 630-642. doi: 10.1002/bit.20259.
- Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., and Michalski, J.C. (2004). Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem J* 384(Pt 2), 307-316. doi: 10.1042/bj20040605.
- Roe, A.J., Currie, C., Smith, D.G., and Gally, D.L. (2001). Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiology* 147(Pt 1), 145-152. doi: 10.1099/00221287-147-1-145.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.A., Glasser, A.L., Ranc, J., Hebuterne, X., et al. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* 59(10), 1355-1362. doi: 10.1136/gut.2010.207456.
- Rolhion, N., Carvalho, F.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* 63(6), 1684-1700. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x.
- Rossi, E., Cimdins, A., Luthje, P., Brauner, A., Sjoling, A., Landini, P., et al. (2017). "It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol*, 1-30. doi: 10.1080/1040841x.2017.1303660.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U., and Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281(41), 30310-30314. doi: 10.1074/jbc.C600179200.
- Salvatore, S., Heuschkel, R., Tomlin, S., Davies, S.E., Edwards, S., Walker-Smith, J.A., et al. (2000). A pilot study of N-acetyl glucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14(12), 1567-1579.
- Schembri, M.A., Christiansen, G., and Klemm, P. (2001). FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41(6), 1419-1430.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., and Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48(1), 253-267.

- Schembri, M.A., and Klemm, P. (2001). Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infect Immun* 69(3), 1322-1328. doi: 10.1128/iai.69.3.1322-1328.2001.
- Schwan, W.R. (2011). Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis* 1(1), 17-25. doi: 10.5495/wjcid.v1.i1.17.
- Serra, D.O., Richter, A.M., and Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol* 195(24), 5540-5554. doi: 10.1128/jb.00946-13.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., et al. (2016a). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 121(2), 309-319. doi: 10.1111/jam.13078.
- Sharma, V.K., Bearson, S.M., and Bearson, B.L. (2010). Evaluation of the effects of sdiA, a luxR homologue, on adherence and motility of *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* 156(Pt 5), 1303-1312. doi: 10.1099/mic.0.034330-0.
- Sharma, V.K., Kudva, I.T., Bearson, B.L., and Stasko, J.A. (2016b). Contributions of EspA Filaments and Curli Fimbriae in Cellular Adherence and Biofilm Formation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One* 11(2), e0149745. doi: 10.1371/journal.pone.0149745.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A.D., and Nataro, J.P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41(5), 983-997.
- Sherlock, O., Schembri, M.A., Reisner, A., and Klemm, P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* 186(23), 8058-8065. doi: 10.1128/jb.186.23.8058-8065.2004.
- Sherlock, O., Vejborg, R.M., and Klemm, P. (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* 73(4), 1954-1963. doi: 10.1128/iai.73.4.1954-1963.2005.
- Sherrard, L.J., Tunney, M.M., and Elborn, J.S. (2014). Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet* 384(9944), 703-713. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61137-5.
- Sicard, J.F., Le Bihan, G., Vogeleeer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 387. doi: 10.3389/fcimb.2017.00387.
- Smirnova, M.G., Guo, L., Birchall, J.P., and Pearson, J.P. (2003). LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* 221(1), 42-49.
- Sohanpal, B.K., El-Labany, S., Lahooti, M., Plumbridge, J.A., and Blomfield, I.C. (2004). Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(46), 16322-16327. doi: 10.1073/pnas.0405821101.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15), 8951-8956. doi: 10.1073/pnas.1537100100.
- Stevens, C., Henderson, P., Nimmo, E.R., Soares, D.C., Dogan, B., Simpson, K.W., et al. (2013). The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut* 62(5), 695-707. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301775.
- Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* 62(5), 762-769. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x.

- Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D., et al. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(18), 5130-5140.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(1), 44-54. doi: 10.1053/gast.2002.30294.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., and Herber, A. (2009). Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 6, 61-71.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L.P. (2005a). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 11(8), 1131-1140.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005b). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43(7), 3380-3389. doi: 10.1128/jcm.43.7.3380-3389.2005.
- Tapiainen, T., Hanni, A.M., Salo, J., Ikaheimo, I., and Uhari, M. (2014). *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33(1), 111-115. doi: 10.1007/s10096-013-1935-4.
- Tremblay, Y.D., Vogeeler, P., Jacques, M., and Harel, J. (2015). High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 81(8), 2827-2840. doi: 10.1128/aem.04208-14.
- Troge, A., Scheppach, W., Schroeder, B.O., Rund, S.A., Heuner, K., Wehkamp, J., et al. (2012). More than a marine propeller--the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int J Med Microbiol* 302(7-8), 304-314. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.09.004.
- Uhlich, G.A., Keen, J.E., and Elder, R.O. (2001). Mutations in the csgD promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 67(5), 2367-2370. doi: 10.1128/aem.67.5.2367-2370.2001.
- Valenski, M.L., Harris, S.L., Spears, P.A., Horton, J.R., and Orndorff, P.E. (2003). The Product of the fimI gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis. *J Bacteriol* 185(16), 5007-5011.
- Vejborg, R.M., Hancock, V., Petersen, A.M., Krogfelt, K.A., and Klemm, P. (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* 12, 316. doi: 10.1186/1471-2164-12-316.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, B.S., and Patil, B.S. (2010). Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *Int J Food Microbiol* 140(2-3), 109-116. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.012.
- Vogeeler, P., Tremblay, Y.D., Jubelin, G., Jacques, M., and Harel, J. (2015). Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Appl Environ Microbiol* 82(5), 1448-1458. doi: 10.1128/aem.02983-15.
- Vogeeler, P., Tremblay, Y.D., Mafu, A.A., Jacques, M., and Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 5, 317. doi: 10.3389/fmicb.2014.00317.
- Vogt, S.L., Pena-Diaz, J., and Finlay, B.B. (2015). Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34, 106-115. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.002.

- Walker, A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., et al. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 11, 7. doi: 10.1186/1471-2180-11-7.
- Walters, M., and Sperandio, V. (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 296(2-3), 125-131. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.041.
- Wang, X., Preston, J.F., 3rd, and Romeo, T. (2004). The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* 186(9), 2724-2734.
- Whitney, J.C., and Howell, P.L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 21(2), 63-72. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.001.
- Wood, T.K., Gonzalez Barrios, A.F., Herzberg, M., and Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(2), 361-367. doi: 10.1007/s00253-005-0263-8.
- Wurpel, D.J., Totsika, M., Allsopp, L.P., Hartley-Tassell, L.E., Day, C.J., Peters, K.M., et al. (2014). F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* are expressed at low temperature and recognise Galbeta1-3GlcNAc-containing glycans. *PLoS One* 9(3), e93177. doi: 10.1371/journal.pone.0093177.
- Yang, K., Meng, J., Huang, Y.C., Ye, L.H., Li, G.J., Huang, J., et al. (2014). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. *Cell Biochem Biophys* 70(1), 391-398. doi: 10.1007/s12013-014-9924-5.
- Ye, J., Song, L., Liu, Y., Pan, Q., Zhong, X., Li, S., et al. (2015). Core 2 Mucin-Type O-Glycan Is Related to EPEC and EHEC O157:H7 Adherence to Human Colon Carcinoma HT-29 Epithelial Cells. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-015-3548-5.
- Yu, S., Gu, J., Wang, H.G., Wang, Q.X., Luo, P., Wu, C., et al. (2011). Identification of a novel linear epitope on EspA from enterohemorrhagic *E. coli* using a neutralizing and protective monoclonal antibody. *Clin Immunol* 138(1), 77-84. doi: 10.1016/j.clim.2010.09.009.
- Zahedipour, F., Dalirfardouei, R., Karimi, G., and Jamialahmadi, K. (2017). Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. *Biomed Pharmacother* 95, 1051-1058. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.122.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., and Romling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* 71(7), 4151-4158.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39(6), 1452-1463.



## **ANNEXE**

**Revue scientifique publié dans « Frontiers in Cellular and Infection Microbiology ».**

## **Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus**

Jean-Félix Sicard<sup>1</sup>, Guillaume Le Bihan<sup>1</sup>, Philippe Vogeleer<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>2</sup> and Josée Harel<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

\*Corresponding author

Josée Harel  
Université de Montréal,  
Faculté de médecine vétérinaire,  
3200 Sicotte,  
St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

[josee.harel@umontreal.ca](mailto:josee.harel@umontreal.ca)

## **ABSTRACT**

The human gut is colonized by a variety of large amounts of microbes that are collectively called intestinal microbiota. Most of these microbial residents will grow within the mucus layer that overlies the gut epithelium and will act as the first line of defense against both commensal and invading microbes. This mucus is essentially formed by mucins, a family of highly glycosylated protein that are secreted by specialize cells in the gut. In this Review, we examine how commensal members of the microbiota and pathogenic bacteria use mucus to their advantage to promote their growth, develop biofilms and colonize the intestine. We also discuss how mucus-derived components act as nutrient and chemical cues for adaptation and pathogenesis of bacteria and how bacteria can influence the composition of the mucus layer.

**Keywords: Mucus, commensals, pathogens, biofilm, microbiota, microflora, goblet cells**

The number of figures: 1

The number of tables: 2

## INTRODUCTION

The gastrointestinal tract harbors a complex bacterial community called the intestinal microbiota that, in healthy conditions, maintains a commensal relationship with our body. Various mechanisms are used by the host to keep intestinal homeostasis and to prevent aberrant immune responses directed against the microbiota. One of these is the production of a mucus layer that covers the epithelial cells of the gut. This mucus is synthesized and secreted by host goblet cells and form an integral structural component of the mammal intestine. Its major function is to protect the intestinal epithelium from damage caused by food and digestive secretions (Deplancke and Gaskins, 2001). The mucus layer provides a niche for bacterial colonization because it contains attachment sites and is also a carbon source (Harel et al., 1993). Effectively, the mucus is a direct source of carbohydrates that are released in the lumen. Therefore, several bacterial species of the microbiota can use mucus glycan as a carbon source (Ouwerkerk et al., 2013). An alteration in glycan availability modifies the composition of the microbiota (Martens et al., 2008). The mucus layer also prevents pathogens from reaching and persisting on the intestinal epithelial surfaces and thereby is a major component of innate immunity. It is constantly renewed and acts as a trap for commensal residents, but also for pathogens, preventing their access to the epithelia (Johansson et al., 2008; Bertin et al., 2013). Although its composition and thickness vary along the gut, the mucus layer is mainly formed of glycoproteins containing different glycans; nonspecific antimicrobial molecules such as antimicrobial peptides (AMP); secreted antibodies targeting specific microbial antigens; and other intestinal proteins (McGuckin et al., 2011; Antoni et al., 2014). Interaction with the mucus layer is important for the colonization of gut commensals as well as some pathogens that have evolved to adhere to mucus and exploit it (Juge, 2012). Some pathogens also use mucus components as a cue to modulate the expression of virulence genes and thereby adapt to the host environment. In this Review, we describe the interactions between bacteria and components of the human mucus layer: their use as carbon sources, adhesion sites and their genetic adaptation (Figure 1).

## THE GASTROINTESTINAL MUCUS

### Mucus composition

The intestinal mucus is composed mainly of mucins that are complex agglomerates of structural glycoproteins with specific O-linked glycans (O-glycans) produced by specialized cells of the host called goblet cells (Forstner, 1995). Mucins can either be secreted and form a gel or be produced as membrane-bound glycoproteins that are part of the epithelial glycocalyx (Johansson et al., 2008; Johansson et al., 2011; Jonckheere et al., 2013; Nilsson et al., 2014). These glycoproteins share a common structure made of tandem repeated amino acids rich in proline, threonine and serine and are called PTS domains. These sequences of amino acid provide sites for the covalent attachment of the polysaccharides and are widely O-glycosylated (Moran et al., 2011). Four different types of polysaccharide core structures are commonly found in mucin glycoproteins. These cores are formed by a combination of three polysaccharides, galactose, N-acetyl-galactosamine and N-acetyl-glucosamine (Larsson et al., 2009; Juge, 2012). Different chains of glycan will be attached to the core. The terminal monosaccharide is usually a fucose or a sialic acid (Larsson et al., 2009; Juge, 2012). Oligosaccharide chains are also sulfated, especially in colonic regions (Rho et al., 2005). The mucin proteins MUC1, MUC5AC and MUC6 mainly form the mucus layer in the stomach, whereas MUC2 is the most abundant mucin in the small intestine and the colon (Johansson et al., 2009; Moran et al., 2011). The thickness of the mucus layer varies through the gut. The colon, which harbors the highest density of microorganisms, is covered by the thickest mucus layer (Gum et al., 1994). It is composed of an inner layer that is dense and firmly attached to the epithelium and an outer loose layer that is exposed to bacterial proteolytic activity. The numerous O-glycans of the outer layer can serve as adhesion sites and as nutrients for bacteria while the inner layer is less permissive to bacterial penetration in healthy individuals (Johansson et al., 2008; Johansson et al., 2011). Most bacterial residents are present in the outer mucus layer and the competition for survival in this niche shapes the composition of the microbiota. The differential resource utilization of bacterial species participates to the establishment of distinct communities that includes non-mucolytic bacteria (Li et al., 2015).

### **Role of the mucus layer**

The mucus barrier has an important role in regulating the severity of infectious diseases. It provides protection against many intestinal pathogens, including *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* and *Citrobacter rodentium* (Mantle and Rombough, 1993; Bergstrom et al., 2010; Arike and Hansson, 2016). MUC2 (Mouse, Muc2) plays a crucial role during infection. Using *Muc2*-deficient mice, it was shown that the glycoprotein is critical in controlling *Salmonella* infection (Zarepour et al., 2013). Moreover, *Muc2*<sup>-/-</sup> mice revealed higher susceptibility to attaching and effacing (A/E) *Citrobacter rodentium* infections (Bergstrom et al., 2010).

An alteration of mucosal integrity is generally associated with health problems such as inflammatory bowel diseases, including ulcerative colitis and Crohn's disease (Trabucchi et al., 1986; Hanski et al., 1999). During ulcerative colitis, alteration of mucus integrity results in a thinner mucus layer due to goblet cell depletion (Pullan et al., 1994) and a reduced O-glycosylation and sulfation of mucins (Raouf et al., 1992; Larsson et al., 2011). During Crohn's disease, the mucus layer is essentially continuous and comparable to healthy mucosa (Strugala et al., 2008) although there is evidence of abnormal expression and glycosylation of the mucin (Buisine et al., 2001; Moehle et al., 2006; Dorofeyev et al., 2013). These changes in the mucosal environment could also be linked to dysbiosis, an abnormal change in the composition of the intestinal microbiota due to Crohn's disease. Once impaired, the mucus barrier becomes permeable to bacteria that are able to access the epithelium and therefore cause inflammation (Antoni et al., 2014; Johansson et al., 2014), which is why the integrity of the mucus layer is critical for the upkeep of a homeostatic relationship between the intestinal microbiota and its host.

### **MUCIN AS A GROWTH SUBSTRATE**

Mucin proteins are highly glycosylated and therefore constitute a carbon and energy source for intestinal microbiota. A key nutritional aspect of the mucus layer for gut

bacteria is its high polysaccharide content with up to 80% of the mucin biomass being composed of mostly O-linked glycans (Johansson et al., 2009; Johansson et al., 2011; Marcobal et al., 2013).

### **Mucolytic bacteria**

A distinct subset of intestinal bacteria possesses the enzymatic activity, such as glycosidases, necessary for the degradation of mucin oligosaccharides, which can be further metabolized by resident microbiota (Koropatkin et al., 2012; Ouwerkerk et al., 2013). Indeed, various anaerobic bacteria species of gut microbiota, such as *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004; Png et al., 2010), *Bacteroides thetaiotaomicron* (Xu et al., 2003; Sonnenburg et al., 2005), *Bifidobacterium bifidum* (Crociani et al., 1994; Png et al., 2010; Garrido et al., 2011), *Bacteroides fragilis* (Macfarlane and Gibson, 1991; Swidsinski et al., 2005a; Huang et al., 2011), *Ruminococcus gnavus* (Png et al., 2010; Crost et al., 2013) and *Ruminococcus torques* (Hoskins et al., 1985; Png et al., 2010) are now known as mucin-degrading specialists. These bacteria will use their specific enzymatic activities to release monosaccharides attached to the mucin glycoproteins. Some mucolytic bacteria, such as *B. thetaiotaomicron*, that possess an important variety of glycosidases, are better suited for the utilisation of a wide range of glycans (Xu et al., 2003; Marcobal et al., 2013). To complete the degradation of mucins, a combination of enzymatic activity of several mucolytic bacteria is needed (Derrien et al., 2010; Marcobal et al., 2013). Therefore, MUC2 glycans act as nutritional sources for bacteria that can utilize the mucus-derived sugars but lack the enzymes necessary for cleaving sugar linkages (Johansson et al., 2015; Arike and Hansson, 2016). Commonly, several bacteria collaborate in a community and it has been shown that the sulfatase activity of some commensal bacteria on sulfomucin allows glycosidases to access and act on mucins (Rho et al., 2005). Released saccharides such as *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc also called NAG), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), galactose, fucose and sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid also called NANA) can then be used by the degrader itself or by other resident bacteria (Bjursell et al., 2006; Martens et al., 2008; Sonnenburg et al., 2010) . As example, commensal *E. coli* that are limited to



growth on mono- or disaccharides, are unable to degrade the complex polysaccharides that constitute mucin (Hoskins et al., 1985) and therefore use such carbohydrate sources (Chang et al., 2004; Png et al., 2010; Bertin et al., 2013). Another example is vancomycin-resistant *Enterococcus* that can grow on mucin pre-digested with extracts from human stools, but not on purified mucin. This suggests that *Enterococcus* can benefit of the microbiota activity on mucin and use released mucus-derived products (Pultz et al., 2006). In this way, mucolytic bacteria make mucus O-glycan derived products also available for other bacterial residents.

### **Use of mucus-derived nutrients by pathogens**

Intestinal pathogens have developed strategies to compete with commensal microflora for nutrients such as carbohydrates and these strategies have been reviewed in (Conway and Cohen, 2015; Vogt et al., 2015; Baumler and Sperandio, 2016). Pathogenic and commensal *E. coli* strains displayed considerable catabolic diversity when colonizing streptomycin-treated mice, indicating that nutrient availability can influence their colonization success and their niche adaptation (Maltby et al., 2013). For example, pathogenic *E. coli* such as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain EDL933 efficiently utilize some mucus-derived monosaccharides. This can provide competitive growth compared to that of commensal *E. coli* (Fabich et al., 2008). Moreover, the metabolic flexibility of some pathogenic strains to use both glycolytic and gluconeogenic nutrients may be advantageous (Bertin et al., 2013). The pathogen *Vibrio cholerae*'s preferential use of mucus-derived monosaccharides such as GlcNAc and sialic acid confers an advantage in the infant mouse model of infection (Almagro-Moreno et al., 2015). *C. jejuni* also possess the ability to metabolize fucose. Its growth is enhanced in culture medium supplemented with it (Alemka et al., 2012). In addition, antibiotic treatment also perturbs the microbiota and therefore affects the availability of mucin carbohydrates. The concentration of free fucose and sialic acid reaching high levels during antibiotic treatment facilitates expansion of pathogens such as *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Clostridium difficile* (Ng et al., 2013). In addition, *Salmonella* serotype Typhimurium is known both to bind glycoprotein containing sialic acids (Vimal et al.,

2000) and to have the ability to release the carbohydrate using its sialidase (Hoyer et al., 1992). Thereby, to colonize specific niches, many pathogens have evolved in a way to use mucus-derived sugars as a carbon source.

## **BACTERIAL ADHESION TO MUCINS**

Mucins proteins are highly glycosylated. Their O-glycans are used as ligands for bacterial adhesins (Juge, 2012). It can be speculated that adhesion to mucins may initiate colonization of the intestine. The carbohydrate structures on mucins can provide initial attachment site to bacteria including specialized pathogens and could facilitate the invasion of epithelial cells (Derrien et al., 2010). As example, pathogenic microorganisms such as *Campylobacter* and enterotoxinogenic *E. coli* (ETEC) are known to adhere to the glycoprotein MUC1 that is present in human breast milk. This interferes with colonization of these pathogens in the infant GI tract (Martin-Sosa et al., 2002; Ruiz-Palacios et al., 2003). Although no specific mucus-adherent microflora was identified (van der Waaij et al., 2005), there are evidence that bacteria can bind directly to mucins by expressing specific proteins, pili, fimbriae and flagella (Table 1).

### **Interactions between mucin and surface proteins**

To adhere to mucus, commensal and pathogenic bacteria use different strategies. First, they can produce proteins that specifically bind the mucus. Mucus-binding proteins (MUB) are cell-surface proteins mainly described in lactic acid bacteria (LAB) (Boekhorst et al., 2006), especially in *Lactobacillus reuteri* (Roos and Jonsson, 2002; MacKenzie et al., 2009). MUB contain domains that are similar to the model mucin-binding protein (MucBP) from the Pfam database (Boekhorst et al., 2006). The MucBP domain is found in a variety of bacterial proteins that are known for their capacity to adhere to mucus (Juge, 2012). MUB also share structural and functional homology with pathogenic Gram-positive adhesins that have specificity to sialylated mucin glycans (Etzold et al., 2014). For example, some surface proteins of *Listeria monocytogenes* contain a MucBP domain similar to those found in

*Lactobacillus*, allowing them to adhere to mucin (Bierne et al., 2007; Mariscotti et al., 2014). The causative agent of cholera, *V. cholerae*, can also bind to mucin using surface protein called GbpA (chitin-binding protein) that binds specifically to N-acetyl D-glucosamine residues of intestinal mucins (Bhowmick et al., 2008). In addition, *C. jejuni* is well known for its ability to interact with different human histoblood group antigens (HBGAs) expressed in mucosa (Naughton et al., 2013). The major outer membrane protein (MOMP) of *C. jejuni* is involved in these interactions (Mahdavi et al., 2014). This way, *C. jejuni* can interact with intestinal mucin MUC2 in the intestine (Tu et al., 2008). Furthermore, *Bifidobacterium* spp. is also known for its specific adhesion to mucus. For example, in a *B. bifidum* mucin-binding assay, the expression of an extracellular transaldolase correlated with a positive mucin-binding phenotype (Gonzalez-Rodriguez et al., 2012). *B. longum* subsp. *infantis* is another species that binds specifically to mucin using family-1 solute binding proteins (Kankainen et al., 2009). Interestingly, a study using gnotobiotic mice colonized by *B. fragilis* and *E. coli* revealed that the commensal bacterium *B. fragilis* was found in the mucus layer while *E. coli* was only found in the lumen. Further analysis showed that *B. fragilis* specifically binds to highly purified mucins. This indicated that a direct bond with intestinal mucus could be a mechanism used by *B. fragilis* for gut colonization (Huang et al., 2011).

### **Interactions between mucin and pili/fimbriae**

In addition to produce specific mucus binding proteins, some bacteria can also use cell-surface appendix such as pili or fimbriae to bind the mucus. For example, production of pili by LAB was shown to be implicated in mucus-binding activity (Douillard et al., 2013) and moreover, the SpaC pilus protein of *L. rhamnosus* GG was shown to strongly binds the human mucins (Kankainen et al., 2009). An *in vitro* study using mucus-secreting HT29-MTX intestinal epithelial cell model showed that the adhesion of *Salmonellae enterica* serotype Typhimurium to mucus-secreting intestinal epithelial cells was higher than in non- and low-mucus producing cells (Gagnon et al., 2013). Moreover, virulent strains seem to bind more efficiently to mucus than avirulent strains and the binding that preferentially targets the neutral mucin is mannose-dependant (Vimal et al., 2000). As with some uropathogenic *E. coli*

(Wurpel et al., 2014), the adhesion of *S. enterica* serotype Typhimurium could be the result of interaction between fimbrial adhesin and mucin glycans, more specifically terminal fucose residues (Chessa et al., 2009). The *E. coli* K88 (F4) fimbriae is also able to bind mucus from the small intestines of 35-day-old piglets with a specificity to the glycolipid galactosylceramide (Blomberg et al., 1993). Hence, pili and fimbriae are involved in specific adhesion to mucus.

### **Interactions between mucin and flagella**

Many enteric bacteria also produce flagellum. In addition to their role in motility, flagella are also involved in adhesion. As example, the *E. coli* probiotic strain Nissle 1917 was shown to be able to interact, via its flagella, with human and porcine mucus but not with murine mucus. Furthermore, the mucus component gluconate has been identified as one receptor for the adhesion of these flagella (Troge et al., 2012). Other studies have revealed the role of the flagella for the binding of mucin glycoproteins by *C. difficile* (Tasteyre et al., 2001) and pathogenic *E. coli* (Erdem et al., 2007). Indeed, a mutation of the flagellum element *fliC* prevents the adhesion of EPEC and EHEC to mucins (Erdem et al., 2007). More recently, the flagella of EPEC (O127:H6) and EHEC (O157:H7) were shown to adhere to mucin-type core 2 O-glycan in MUC2. *C. jejuni* is another pathogen that uses its flagella to bind mucin. It was showed that the major flagella subunit protein (FlaA) is also involved in the adhesion to HBGA in the mucus. Therefore, flagella can be used in attachment strategies by gut residents.

### **BACTERIAL BIOFILM AND MUCUS**

There are more mucus-associated bacteria in the proximal region of the colon than in distal colonic sites. Among the complex microbial communities within the gut, some are believed to form mucosal biofilm, that is a complex and self-produced polymeric matrix where microorganisms can attach to each other and be attached to the mucosal surface (de Vos, 2015). The rapid growth of the intestinal mucus and the lack of effective preservation techniques complicated the study investigating biofilms in healthy individuals (Bollinger et

al., 2007; de Vos, 2015). However, biofilms were observed in artificial mucin gels that simulate the proximal and distal colon (Macfarlane et al., 2005), and also by electron microscopy in uninflamed proximal large bowel of mice (Swidsinski et al., 2005a), rat, baboon, and humans (Palestrant et al., 2004). Some evidence, such as the rates of plasmids transfer and the expression of colonization factors by gut bacteria, plead for the presence of biofilms in the gut (Macfarlane et al., 1997; Licht et al., 1999; Hooper and Gordon, 2001). In addition, components of the mucus layer, such as secretory IgA (SIgA) and mucins are likely to play a role in biofilm formation as they have been shown to modulate biofilm production *in vitro* (Bollinger et al., 2003; Bollinger et al., 2006; Slizova et al., 2015). Moreover, adherence of bacteria to mucin proteins could lead to growth of microcolonies that could further develop into biofilms (Kleessen and Blaut, 2007). Biofilms could also be formed on the surface of intestinal or gastric epithelia and interact with the secreted or membrane-bound mucins.

Alteration of the mucus layer occurs in cases of inflammatory bowel diseases (Bodger et al., 2006; Baumgart et al., 2007; Sheng et al., 2012). The increased presence of *B. fragilis* group and *Enterobacteriaceae* and their ability to form biofilms could play a role in these diseases (Swidsinski et al., 2005b; Swidsinski et al., 2009). Within the *Enterobacteriaceae* family, the adherent-invasive *E. coli* (AIEC) strains associated with Crohn's disease (Masseret et al., 2001; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Eaves-Pyles et al., 2008; Martinez-Medina et al., 2009a), are shown to be higher biofilm producers than non-AIEC strains (Martinez-Medina et al., 2009b). As with inflammatory bowel diseases, impaired mucin production is related to colorectal cancer (Weiss et al., 1996; Kim and Ho, 2010) that is also linked to the presence of bacterial biofilms (Dejea et al., 2014). Altogether, these studies show that biofilms could play a key role in bacterial colonization of the healthy gut and in intestinal diseases.

## ROLE OF MUCIN COMPONENTS IN MODULATION OF BACTERIAL VIRULENCE

In addition to acting as a carbon source or as receptors, mucin glycoprotein can influence the expression of different genes implicated in colonization and pathogenicity (Vogt et al., 2015). As example, MUC2 in the mucus layer can play a modulatory role in the pathogenesis of pathogens. Indeed, the ability of *S. enterica* serotype Typhimurium to cause cecal pathology in *muc2*<sup>-/-</sup> mice is more dependent on its *invA* gene, coding a *Salmonella* inner membrane protein component of the SPI-1 type 3 secretion system, than it is in wild-type mice (Zarepour et al., 2013). *C. jejuni* can also utilize mucin proteins as a signal to modulate the expression of its virulence factors. Many virulence genes of this pathogen are upregulated in the presence of MUC2 glycoprotein (Tu et al., 2008). Another example is the ability of *V. cholerae* to downregulate the expression of *vps*, coding for its polysaccharide, in response to mucosal signalling and inversely promoting motility in the mucus (Liu et al., 2015). Mucin also activates the two-component sensor histidine kinase ChiS in *V. cholera*. ChiS is the regulator of the chitinases and the chitin utilization pathway, but also plays a role in the virulence of the bacteria since the mutant strain is hypovirulent (Chourashi et al., 2016). Released monosaccharides from mucin *O*-glycans degradation can also act as a chemical cue to help pathogens to sense their environment and adapt accordingly. As such, sialic acid and GlcNAc are signals that regulate type 1 fimbriae gene expression and curli activity in *E. coli* (Barnhart et al., 2006; Konopka, 2012). GlcNAc and sialic acid also play roles in the virulence of EHEC. In aerobic condition, these mucin-derived sugars inhibit EHEC adhesion to epithelial cells. These amino sugars also repress the expression of genes of the locus of enterocyte effacement (LEE) via the transcriptional regulator NagC involved in the regulation of NAG catabolism (Le Bihan et al., 2017). In contrast, as the sole carbon sources under microaerobic conditions, sialic acid and NAG were shown to stimulate the production of EspB, an effector of the LEE (Carlson-Banning and Sperandio, 2016). EHEC and *C. rodentium* also sense fucose by a two-component system FusKR. It represses the expression of virulence genes while promoting growth (Pacheco et al., 2012; Keeney and Finlay, 2013). Moreover, it was also shown that fucose influences chemotaxis and biofilm formation of *C. jejuni* that are important during

infection (Dwivedi et al., 2016). Thus, mucus and its derived sugars can play a role in the expression of virulence genes by pathogens.

## **MODULATION OF MUCIN COMPOSITION BY BACTERIA**

Microbial molecular exchange with the host influences mucin composition. Several bacterial effectors can modulate the expression of mucin by mucus-producing cells (Table 2). Studies using germ-free rats revealed that the presence of microflora through the gastro intestinal tract has a strong and positive influence on the thickness and composition of the mucin (Szentkuti et al., 1990; Enss et al., 1992; Sharma et al., 1995). Different probiotic agents, such as *Lactobacillus* species, can stimulate the production of MUC2 and thereby the secretion of mucin in the intestine, improving pathogen resistance (Mack et al., 1999; Mattar et al., 2002; Caballero-Franco et al., 2007). Other commensal bacteria, such as *B. thetaiotaomicron* can increase the differentiation of goblet cells and their mucus-related gene expression (Wrzosek et al., 2013). Moreover, bacterial fermentation products such as short-chain fatty acids (SCFAs) like butyrate and propionate enhance the production of MUC2 by the goblet cell in the gut (Barcelo et al., 2000; Burger-van Paassen et al., 2009). This could explain the therapeutic effect of butyrate in colitis where the mucin layer is altered (Finnie et al., 1995). Therefore, commensal residents are important in the maintenance of the mucus layer integrity.

### **Modulation of mucin by pathogens**

Pathogens have also adapted mechanisms to modulate mucin secretion to enhance pathogenesis by acting on the mucin-secreting cells, altering or inhibiting mucin production (Table 2). One of them is *S. flexneri* that alters the mucus layer through a type III secretion system-dependent manner. This pathogen will act on different elements such as gene expression, mucin glycosylation and secretion, leading to a less effective mucus barrier (Sperandio et al., 2013). *C. difficile* produce a toxin, ToxA that is responsible for barrier dysfunction and causes severe inflammatory enteritis. ToxA also decreases the mucin

exocytosis of colonic mucus-producing cells (Kelly et al., 1994; Branka et al., 1997). The recognition of bacterial components by these cells can also lead to an increased production and secretion of mucin in order to harm the present pathogen. As example, the adhesion of the EHEC O157:H7 to human colon cells HT-29 leads to an increased expression of MUC2 (Xue et al., 2014). Moreover, the cholera toxin of *V. cholerae* and lysteriolysin O of *L. monocytogenes* enhance the secretion of mucin by goblet cells and HT29-MTX cells respectively (Lencer et al., 1990; Epple et al., 1997; Coconnier et al., 1998; Lievin-Le Moal et al., 2002; Lievin-Le Moal et al., 2005). Surprisingly, the Pic protein secreted by *S. flexneri* and enteroaggregative *E. coli* (Henderson et al., 1999; Harrington et al., 2009) is known for its mucolytic activity, but is also a potent mucus secretagogue that induced hypersecretion of mucus by goblet cells (Navarro-Garcia et al., 2010). These studies show how pathogens can affect the behaviour of mucus-producing cells in their advantage.

#### **Mucin degradation by pathogens.**

Pathogens also developed specific mechanisms to subvert and penetrate the mucus barrier. Some bacteria can directly act on the mucin through a mucinase activity. During enterotoxigenic *E. coli* infections, the autotransporter A (EatA) is involved in mucin degradation and this participate to the delivery of *E. coli* toxins to the cell surface (Kumar et al., 2014). Another example is the adherent and invasive *E. coli* strain LF82, associated with Crohn's disease. LF82 possesses a protease called Vat-AIEC that is implicated in the degradation of mucins and therefore decreases mucus viscosity (Gibold et al., 2016). The Pic autotransporter found in enteroaggregative *E. coli* and *Shigella flexneri* can also degrade various glycoproteins including mucins (Henderson et al., 1999; Harrington et al., 2009). Moreover, the plasmid-bearing *Yersinia enterocolitica*, which contain mucin-degrading enzyme(s), will increase the permeability of the mucus gel layer, allowing the bacteria to move more easily through the mucin (Mantle and Rombough, 1993). *V. cholerae* also produces a secreted protease called TagA that is encoded by the *Vibrio* pathogenicity island (VPI). TagA specifically cleaves mucin glycoproteins and may directly modify host cell surface molecules during *V. cholerae*



infection (Szabady et al., 2011). Therefore, to facilitate their infection process, pathogens can directly modify the mucus.

### **Inflammation and mucins**

Pathogens associated molecular patterns, such as lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan are also known to stimulate mucin production (Pettersson et al., 2011). This stimulation can occur directly on secreting cells, but also be through proinflammatory cytokine production. Recognition of LPS by LPS-binding protein (LBP), CD14 and TLR4 (Toll-Like Receptor) leads to a strong pro-inflammatory response in mammalian cells. LPS has been shown to induce mucin gene expression by binding to TLR4 and LBP (Dohrman et al., 1998; Smirnova et al., 2003). LPS and flagellin from Gram-negative bacteria as well as lipoteichoic acid, a component of the cell wall of Gram-positive bacteria, induce mucin upregulation through the Ras pathway (McNamara and Basbaum, 2001; Theodoropoulos and Carraway, 2007). LPS also increases the production of IL-8 by goblet cells, which leads to secretion of mucin (Smirnova et al., 2003). In addition, pro-inflammatory cytokine IL-6 and TNF- $\alpha$  increase secretion of MUC2, MUC5A, MUC5B and MUC6 by the intestinal cell line *LS180* despite a reduced glycosylation (Enss et al., 2000). Inflammation could be one of the aspects affecting the integrity of the mucus layer in inflammatory bowel diseases. Furthermore, the AIEC strain LF82 is able to alter the expression of the mucin gene and IL-8 of colonic cells T84 that could also lead to a defective mucus layer (Elatrech et al., 2015). Thus, pathogens can also alter the mucus production indirectly, through inflammation.

### **CONCLUSION**

Intestinal bacteria have adapted to colonize the mucus layer by adhering to intestinal mucus components, using mucus-derived nutrients and sensing chemical cues for adaptation. In many ways, pathogenic bacteria have used these strategies for successful infection. There has been growing recognition of the important role played by the mucus barrier and

microbiota and their interaction with the pathogens in regulating the severity of infectious diseases. But, the precise mechanisms by which enteric bacterial pathogens interact with mucus components in combination with the microbiota activity are being investigated. As the mucus layer acts as a first line of defense against enteric bacteria, further investigations are needed to understand the interactions between pathogens, microbiota and the mucus layer, in order to develop efficient therapeutic strategies. Identifying and characterizing specific mucin signal(s) and corresponding regulatory adaptation and virulence responses could contribute to the development of new anti-infective strategies. In doing so, other weapons could be added to the arsenal against intestinal pathogens.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

## **Authors Contributions**

This review was written by all authors.

## **Glossary**

MLG	Mucus gel layer
A/E	Attaching and effacing
NAG	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine
NANA	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
MUB	Mucus-binding proteins
LAB	Lactic acid bacteria
HBGA	Histoblood group antigen
SIgA	Secretory IgA
AIEC	Adherent Invasive <i>E. coli</i>
LPB	LPS-binding protein
TLR	Toll-like receptor
VPI	<i>Vibrio</i> pathogenicity island

## **Acknowledgements**

We thank Judith Kashul for editing the manuscript.

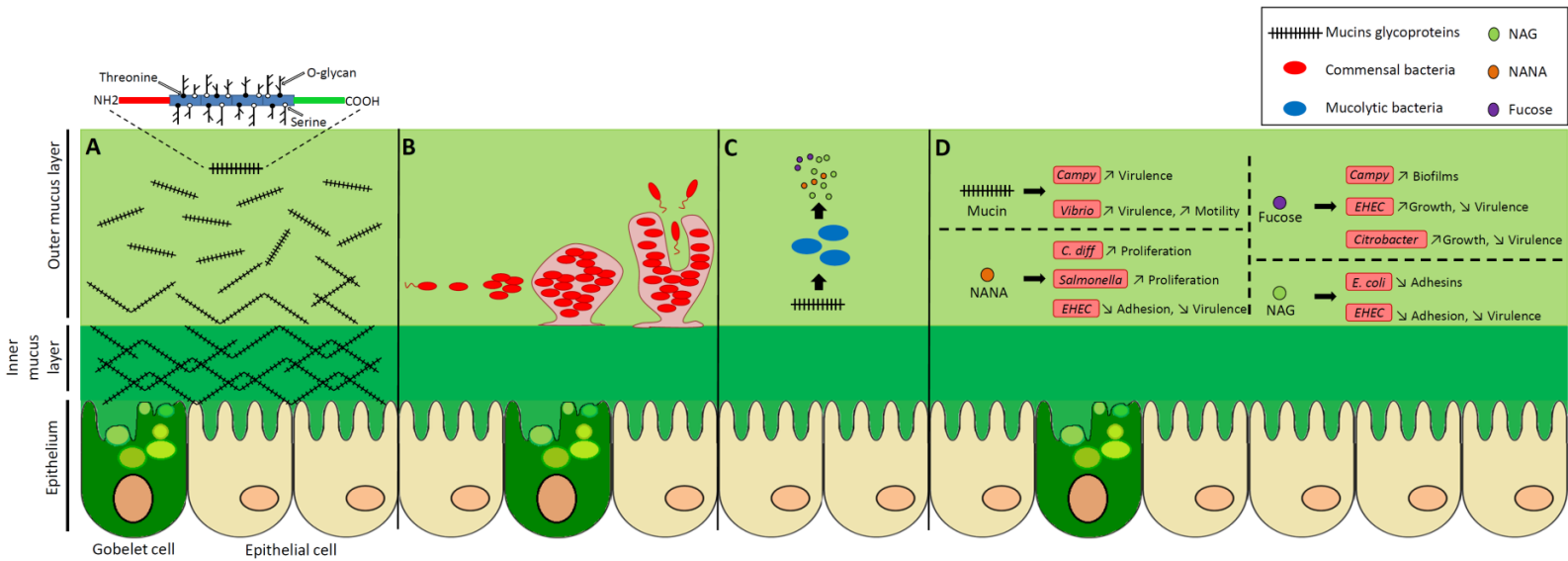
This research was supported by a Team grant from the Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies (FRQNT PT165375), to J.H. and M.J. and by the Discovery grant program of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2015-05373 to J.H. and to M.J). J.-F.S. is a recipient of a scholarship from the NSERC Collaborative Research and Training Experience Program in Milk Quality; and P.V. was a recipient of a scholarship from the FRQNT Québec Wallonie program.

**Table 1. Bacterial adhesion to mucin components**

Bacteria	Adhesin	Mucin glycoprotein	Mucin component	References	
<b>Commensal bacteria</b>					
<i>Bacteroides fragilis</i>				(Huang et al., 2011)	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Extracellular transaldolase			(Marcobal et al., 2013)	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Family 1 of solute binding proteins		Mucin oligosaccharides	(Garrido et al., 2011)	
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Flagellum			(Troge et al., 2012)	
Lactic acid bacteria	MUB			(Boekhorst et al., 2006)	
	Pili			(Kankainen et al., 2009; Le et al., 2013)	
<b>Pathogens</b>					
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carbohydrate-lectin, FlaA, MOMP	MUC2		(Tu et al., 2008; Naughton et al., 2013; Mahdavi et al., 2014)	
<i>Clostridium difficile</i>	FliC		Cecal mucus	(Tasteyre et al., 2001)	
	FliD				
<i>Escherichia coli</i>	UPEC CFT073	F9 fimbriae	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc structures	(Wurpel et al., 2014)	
	EPEC E2348/69	H6 flagella	MUC2	Mucin-type core 2 O-glycan	(Erdem et al., 2007; Ye et al., 2015)
	EHEC EDL933	H7 flagella	MUC2	Mucin-type core 2 O-glycan	(Erdem et al., 2007; Ye et al., 2015)
<i>Listeria monocytogenes</i>	LPXTG-internalin proteins (MucBP) LmiA			(Bierne et al., 2007; Mariscotti et al., 2014)	
<i>Salmonellae enterica</i> serotype Typhimurium	Fimbrial adhesin (std operon)		Alpha1-2 fucosylated receptor(s)	(Chessa et al., 2009)	
<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrio polysaccharide (VPS)			(Liu et al., 2015)	
	Chitin-binding protein (GbpA)		N-acetyl D-glucosamine	(Bhowmick et al., 2008)	

**Table 2. Effects of bacterial effectors on mucin**

Bacteria	Effector	Target	Effect on mucin	Ref	
<i>Campylobacter jejuni</i>		Distal colonic biopsies	Increased expression of MUC1	(Linden et al., 2008)	
<i>Clostridium difficile</i>		Distal colonic biopsies	Increased expression of MUC1	(Linden et al., 2008)	
	ToxA	HT-29 Cells	Decrease of mucin exocytosis	(Kelly et al., 1994; Branka et al., 1997)	
<i>E. coli</i>	EAEC	Secreted protein Pic	Hog gastric, bovine sub-maxillary and crude mouse large intestine mucin Goblet cells	Mucinase activity / Degradation Secretagogue activity / Hypersecretion	(Henderson et al., 1999; Harrington et al., 2009) (Navarro-Garcia et al., 2010)
	ETEC	Secreted EatA	Purified MUC2	Degradation of MUC2	(Kumar et al., 2014)
	AIEC (LF82)		T84 cells	Diminished expression of MUC2 and MUC5A	(Elatrech et al., 2015)
	EHEC (O157:H7)	Adhesion	HT-29 Cells	Increased expression of MUC2	(Xue et al., 2014)
<i>Lacto-bacillus</i>	<i>plantarum</i> 299v		HT-29 cells	Increased MUC2 secretion	(Mack et al., 1999)
	<i>rhamnosus</i> GG		HT-29 cells	Increased MUC2 secretion	(Mack et al., 1999)
	<i>casei</i> GG		Caco-2 cells	Increased MUC2 secretion	(Mattar et al., 2002)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listerioly sin O (LLO)	HT29-MTX Cells	Increased transcription of MUC3, MUC4 and MUC12 Increased secretion of MUC5A	(Coconnier et al., 1998; Lievin-Le Moal et al., 2002; Lievin-Le Moal et al., 2005)	
<i>Salmonella</i> St Paul		Distal colonic biopsies	Increased expression of MUC1	(Linden et al., 2008)	
<i>Shigella flexneri</i>	SST3	Mucin-producing polarized human intestinal epithelial cells	Alteration of glycosylation/ Increased permeability	(Sperandio et al., 2013)	
	Secreted protein Pic	Hog gastric, bovine sub-maxillary, crude mouse large-intestine mucin Goblet cells	Mucinase activity / Degradation Secretagogue activity / Hypersecretion	(Henderson et al., 1999; Harrington et al., 2009) (Navarro-Garcia et al., 2010)	
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxin CT	Goblet cells	Increased mucin secretion	(Lencer et al., 1990; Epple et al., 1997)	
	Secreted TagA	LS174T goblet cell surface mucin	Cleaves mucin glycoproteins	(Szabady et al., 2011)	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Virulence Plasmid	Rabbit small intestinal mucin	Degradation/Solubilisation	(Mantle and Rombough, 1993)	



**Figure 1.**

**Bacterial activities in the colonic mucus layer environment.** The colonic epithelium is covered by a mucus gel layer formed of glycoproteins called mucins. (A) Mucins consist of a protein core and a high number of O-linked glycans. They are secreted by goblet cells and are assembled into a net-like structure that forms a dense inner layer, firmly attached to cells, that does not allow bacteria to penetrate. Further from the epithelium, the outer layer becomes loose and permissive, providing a niche for intestinal bacteria. (B) Mucus oligosaccharides can act as adhesion sites for bacteria, facilitating their colonization. Some bacteria are able to form microcolonies and biofilms. (C) Bacteria with mucoytic activity can release monosaccharides from mucin O-glycans and metabolize them. These sugars can also be utilized by nearby bacteria. (D) Mucus components can influence the behavior of pathogenic bacteria by increasing or decreasing their virulence expression, adhesion, motility, proliferation or growth.

## References

- Alemka, A., Corcionivoschi, N., and Bourke, B. (2012). Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 15. doi: 10.3389/fcimb.2012.00015.
- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., and Taylor, R.K. (2015). Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog* 11(5), e1004787. doi: 10.1371/journal.ppat.1004787.
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2014). Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20(5), 1165-1179. doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165.
- Arike, L., and Hansson, G.C. (2016). The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J Mol Biol* 428(16), 3221-3229. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.010.
- Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J.A., Cuber, J.C., and Plaisancie, P. (2000). Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46(2), 218-224.
- Barnhart, M.M., Lynem, J., and Chapman, M.R. (2006). GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188(14), 5212-5219. doi: 10.1128/jb.00234-06.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., et al. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme j* 1(5), 403-418. doi: 10.1038/ismej.2007.52.
- Baumler, A.J., and Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 535(7610), 85-93. doi: 10.1038/nature18849.
- Bergstrom, K.S., Kisson-Singh, V., Gibson, D.L., Ma, C., Montero, M., Sham, H.P., et al. (2010). Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog* 6(5), e1000902. doi: 10.1371/journal.ppat.1000902.
- Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., de la Foye, A., Harel, J., et al. (2013). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol* 15(2), 610-622. doi: 10.1111/1462-2920.12019.
- Bhowmick, R., Ghosal, A., Das, B., Koley, H., Saha, D.R., Ganguly, S., et al. (2008). Intestinal adherence of *Vibrio cholerae* involves a coordinated interaction between colonization factor GbpA and mucin. *Infect Immun* 76(11), 4968-4977. doi: 10.1128/iai.01615-07.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* 9(10), 1156-1166. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.003.
- Bjursell, M.K., Martens, E.C., and Gordon, J.I. (2006). Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *J Biol Chem* 281(47), 36269-36279. doi: 10.1074/jbc.M606509200.
- Blomberg, L., Krivan, H.C., Cohen, P.S., and Conway, P.L. (1993). Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. *Infect Immun* 61(6), 2526-2531.
- Bodger, K., Halfvarson, J., Dodson, A.R., Campbell, F., Wilson, S., Lee, R., et al. (2006). Altered colonic glycoprotein expression in unaffected monozygotic twins of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 55(7), 973-977. doi: 10.1136/gut.2005.086413.

- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., and Siezen, R.J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* 152(Pt 1), 273-280. doi: 10.1099/mic.0.28415-0.
- Bollinger, R.R., Barbas, A.S., Bush, E.L., Lin, S.S., and Parker, W. (2007). Biofilms in the normal human large bowel: fact rather than fiction. *Gut* 56(10), 1481-1482.
- Bollinger, R.R., Everett, M.L., Palestrant, D., Love, S.D., Lin, S.S., and Parker, W. (2003). Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology* 109(4), 580-587.
- Bollinger, R.R., Everett, M.L., Wahl, S.D., Lee, Y.H., Orndorff, P.E., and Parker, W. (2006). Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. *Mol Immunol* 43(4), 378-387. doi: 10.1016/j.molimm.2005.02.013.
- Branka, J.E., Vallette, G., Jarry, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Van, P.N., et al. (1997). Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 112(6), 1887-1894.
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.C., Colombel, J.F., Porchet, N., et al. (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 49(4), 544-551.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., et al. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J* 420(2), 211-219. doi: 10.1042/bj20082222.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(1), G315-322. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2006.
- Carlson-Banning, K.M., and Sperandio, V. (2016). Catabolite and Oxygen Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence. *MBio* 7(6). doi: 10.1128/mBio.01852-16.
- Chang, D.E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., et al. (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19), 7427-7432. doi: 10.1073/pnas.0307888101.
- Chessa, D., Winter, M.G., Jakomin, M., and Baumler, A.J. (2009). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Mol Microbiol* 71(4), 864-875. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x.
- Chourashi, R., Mondal, M., Sinha, R., Debnath, A., Das, S., Koley, H., et al. (2016). Role of a sensor histidine kinase ChiS of *Vibrio cholerae* in pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 306(8), 657-665. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.09.003.
- Coconnier, M.H., Dliissi, E., Robard, M., Laboisie, C.L., Gaillard, J.L., and Servin, A.L. (1998). *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of listeriolysin O. *Infect Immun* 66(8), 3673-3681.
- Conway, T., and Cohen, P.S. (2015). Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M.M., and Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int J Food Microbiol* 24(1-2), 199-210.
- Crost, E.H., Tailford, L.E., Le Gall, G., Fons, M., Henrissat, B., and Juge, N. (2013). Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent. *PLoS One* 8(10), e76341. doi: 10.1371/journal.pone.0076341.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., et al. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127(2), 412-421.



- de Vos, W.M. (2015). Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes* 1, 15005. doi: 10.1038/npjbiofilms.2015.5.
- Dejea, C.M., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., White, J.R., Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., et al. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(51), 18321-18326. doi: 10.1073/pnas.1406199111.
- Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 73(6), 1131s-1141s.
- Derrien, M., van Passel, M.W., van de Bovenkamp, J.H., Schipper, R.G., de Vos, W.M., and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1(4), 254-268. doi: 10.4161/gmic.1.4.12778.
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., and de Vos, W.M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 5), 1469-1476. doi: 10.1099/ijms.0.02873-0.
- Dohrman, A., Miyata, S., Gallup, M., Li, J.D., Chapelin, C., Coste, A., et al. (1998). Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1406(3), 251-259.
- Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Kondratiuk, R.B. (2013). Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013, 431231. doi: 10.1155/2013/431231.
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Jarvinen, H.M., Kant, R., Pietila, T.E., Randazzo, C., et al. (2013). Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. *Appl Environ Microbiol* 79(6), 1923-1933. doi: 10.1128/aem.03467-12.
- Dwivedi, R., Nothaft, H., Garber, J., Xin Kin, L., Stahl, M., Flint, A., et al. (2016). L-fucose influences chemotaxis and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 101(4), 575-589. doi: 10.1111/mmi.13409.
- Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Jezek, G.E., et al. (2008). *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 298(5-6), 397-409. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.05.011.
- Elatrech, I., Marzaioli, V., Boukemara, H., Bournier, O., Neut, C., Darfeuille-Michaud, A., et al. (2015). *Escherichia coli* LF82 Differentially Regulates ROS Production and Mucin Expression in Intestinal Epithelial T84 Cells: Implication of NOX1. *Inflamm Bowel Dis* 21(5), 1018-1026. doi: 10.1097/MIB.0000000000000365.
- Enss, M.L., Cornberg, M., Wagner, S., Gebert, A., Henrichs, M., Eisenblatter, R., et al. (2000). Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res* 49(4), 162-169.
- Enss, M.L., Grosse-Siestrup, H., Schmidt-Wittig, U., and Gartner, K. (1992). Changes in colonic mucins of germfree rats in response to the introduction of a "normal" rat microbial flora. Rat colonic mucin. *J Exp Anim Sci* 35(3), 110-119.
- Epple, H.J., Kreusel, K.M., Hanski, C., Schulzke, J.D., Riecken, E.O., and Fromm, M. (1997). Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch* 433(5), 638-647.
- Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Giron, J.A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189(20), 7426-7435. doi: 10.1128/jb.00464-07.

- Etzold, S., Kober, O.I., Mackenzie, D.A., Tailford, L.E., Gunning, A.P., Walshaw, J., et al. (2014). Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ Microbiol* 16(3), 888-903. doi: 10.1111/1462-2920.12377.
- Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., et al. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 76(3), 1143-1152. doi: 10.1128/IAI.01386-07.
- Finnie, I.A., Dwarakanath, A.D., Taylor, B.A., and Rhodes, J.M. (1995). Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 36(1), 93-99.
- Forstner, G. (1995). Signal transduction, packaging and secretion of mucins. *Annu Rev Physiol* 57, 585-605. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003101.
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., and Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J Microbiol Methods* 94(3), 274-279. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.027.
- Garrido, D., Kim, J.H., German, J.B., Raybould, H.E., and Mills, D.A. (2011). Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveal a preference for host glycans. *PLoS One* 6(3), e17315. doi: 10.1371/journal.pone.0017315.
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmaso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., et al. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 18(5), 617-631. doi: 10.1111/cmi.12539.
- Gonzalez-Rodriguez, I., Sanchez, B., Ruiz, L., Turrioni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., et al. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl Environ Microbiol* 78(11), 3992-3998. doi: 10.1128/aem.08024-11.
- Gum, J.R., Jr., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B., and Kim, Y.S. (1994). Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 269(4), 2440-2446.
- Hanski, C., Born, M., Foss, H.D., Marowski, B., Mansmann, U., Arasteh, K., et al. (1999). Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. *J Pathol* 188(3), 304-311. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199907)188:3<304::aid-path375>3.0.co;2-a.
- Harel, J., Fairbrother, J., Forget, C., Desautels, C., and Moore, J. (1993). Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol* 38(1-2), 139-155.
- Harrington, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., and Nataro, J.P. (2009). The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* 77(6), 2465-2473. doi: 10.1128/iai.01494-08.
- Henderson, I.R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999). Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 67(11), 5587-5596.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519), 1115-1118.
- Hoskins, L.C., Agustines, M., McKee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M., and Niedermeyer, G. (1985). Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75(3), 944-953. doi: 10.1172/jci111795.

- Hoyer, L.L., Hamilton, A.C., Steenbergen, S.M., and Vimr, E.R. (1992). Cloning, sequencing and distribution of the *Salmonella typhimurium* LT2 sialidase gene, nanH, provides evidence for interspecies gene transfer. *Mol Microbiol* 6(7), 873-884.
- Huang, J.Y., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2011). The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe* 17(4), 137-141. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.05.017.
- Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Holmen-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63(2), 281-291. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303207.
- Johansson, M.E., Jakobsson, H.E., Holmen-Larsson, J., Schutte, A., Ermund, A., Rodriguez-Pineiro, A.M., et al. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe* 18(5), 582-592. doi: 10.1016/j.chom.2015.10.007.
- Johansson, M.E., Larsson, J.M., and Hansson, G.C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4659-4665. doi: 10.1073/pnas.1006451107.
- Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39), 15064-15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105.
- Johansson, M.E., Thomsson, K.A., and Hansson, G.C. (2009). Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J Proteome Res* 8(7), 3549-3557. doi: 10.1021/pr9002504.
- Jonckheere, N., Skrypek, N., Frenois, F., and Van Seuningen, I. (2013). Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. *Biochimie* 95(6), 1077-1086. doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.005.
- Juge, N. (2012). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* 20(1), 30-39. doi: 10.1016/j.tim.2011.10.001.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., et al. (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(40), 17193-17198. doi: 10.1073/pnas.0908876106.
- Keeney, K.M., and Finlay, B.B. (2013). Microbiology: EHEC downregulates virulence in response to intestinal fucose. *Curr Biol* 23(3), R108-110. doi: 10.1016/j.cub.2012.12.027.
- Kelly, C.P., Becker, S., Linevsky, J.K., Joshi, M.A., O'Keane, J.C., Dickey, B.F., et al. (1994). Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest* 93(3), 1257-1265. doi: 10.1172/jci117080.
- Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12(5), 319-330. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
- Kleessen, B., and Blaut, M. (2007). Modulation of gut mucosal biofilms. *British Journal of Nutrition* 93(S1), S35. doi: 10.1079/bjn20041346.
- Konopka, J.B. (2012). N-acetylglucosamine (GlcNAc) functions in cell signaling. *Scientifica (Cairo)* 2012. doi: 10.6064/2012/489208.
- Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., and Martens, E.C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 10(5), 323-335. doi: 10.1038/nrmicro2746.
- Kumar, P., Luo, Q., Vickers, T.J., Sheikh, A., Lewis, W.G., and Fleckenstein, J.M. (2014). EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin. *Infect Immun* 82(2), 500-508. doi: 10.1128/iai.01078-13.

- Larsson, J.M., Karlsson, H., Crespo, J.G., Johansson, M.E., Eklund, L., Sjovall, H., et al. (2011). Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 17(11), 2299-2307. doi: 10.1002/ibd.21625.
- Larsson, J.M., Karlsson, H., Sjovall, H., and Hansson, G.C. (2009). A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* 19(7), 756-766. doi: 10.1093/glycob/cwp048.
- Le Bihan, G., Sicard, J.F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A.P., Garrivier, A., et al. (2017). The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 134. doi: 10.3389/fcimb.2017.00134.
- Le, D.T., Tran, T.L., Duviau, M.P., Meyrand, M., Guerardel, Y., Castelain, M., et al. (2013). Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLoS One* 8(11), e79850. doi: 10.1371/journal.pone.0079850.
- Lencer, W.I., Reinhart, F.D., and Neutra, M.R. (1990). Interaction of cholera toxin with cloned human goblet cells in monolayer culture. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1), G96-102.
- Li, H., Limenitakis, J.P., Fuhrer, T., Geuking, M.B., Lawson, M.A., Wyss, M., et al. (2015). The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun* 6, 8292. doi: 10.1038/ncomms9292.
- Licht, T.R., Christensen, B.B., Krogfelt, K.A., and Molin, S. (1999). Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* 145 ( Pt 9), 2615-2622.
- Lievin-Le Moal, V., Huet, G., Aubert, J.P., Bara, J., Forgue-Lafitte, M.E., Servin, A.L., et al. (2002). Activation of mucin exocytosis and upregulation of MUC genes in polarized human intestinal mucin-secreting cells by the thiol-activated exotoxin listeriolysin O. *Cell Microbiol* 4(8), 515-529.
- Lievin-Le Moal, V., Servin, A.L., and Coconnier-Polter, M.H. (2005). The increase in mucin exocytosis and the upregulation of MUC genes encoding for membrane-bound mucins induced by the thiol-activated exotoxin listeriolysin O is a host cell defence response that inhibits the cell-entry of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 7(7), 1035-1048. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00532.x.
- Linden, S.K., Florin, T.H., and McGuckin, M.A. (2008). Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One* 3(12), e3952. doi: 10.1371/journal.pone.0003952.
- Liu, Z., Wang, Y., Liu, S., Sheng, Y., Rueggeberg, K.G., Wang, H., et al. (2015). *Vibrio cholerae* represses polysaccharide synthesis to promote motility in mucosa. *Infect Immun* 83(3), 1114-1121. doi: 10.1128/iai.02841-14.
- Macfarlane, G.T., and Gibson, G.R. (1991). Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 61(2-3), 289-293.
- Macfarlane, S., McBain, A.J., and Macfarlane, G.T. (1997). Consequences of biofilm and sessile growth in the large intestine. *Adv Dent Res* 11(1), 59-68.
- Macfarlane, S., Woodmansey, E.J., and Macfarlane, G.T. (2005). Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 71(11), 7483-7492. doi: 10.1128/aem.71.11.7483-7492.2005.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1), G941-950.

- MacKenzie, D.A., Tailford, L.E., Hemmings, A.M., and Juge, N. (2009). Crystal structure of a mucus-binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity. *J Biol Chem* 284(47), 32444-32453. doi: 10.1074/jbc.M109.040907.
- Mahdavi, J., Pirinccioglu, N., Oldfield, N.J., Carlsohn, E., Stoof, J., Aslam, A., et al. (2014). A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biol* 4, 130202. doi: 10.1098/rsob.130202.
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M.P., Gibson, T., Cohen, P.S., and Conway, T. (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8(1), e53957. doi: 10.1371/journal.pone.0053957.
- Mantle, M., and Rombough, C. (1993). Growth in and breakdown of purified rabbit small intestinal mucin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 61(10), 4131-4138.
- Marcobal, A., Southwick, A.M., Earle, K.A., and Sonnenburg, J.L. (2013). A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology* 23(9), 1038-1046. doi: 10.1093/glycob/cwt040.
- Mariscotti, J.F., Quereda, J.J., Garcia-Del Portillo, F., and Pucciarelli, M.G. (2014). The *Listeria monocytogenes* LPXTG surface protein Lmo1413 is an invasin with capacity to bind mucin. *Int J Med Microbiol* 304(3-4), 393-404. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.01.003.
- Martens, E.C., Chiang, H.C., and Gordon, J.I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 4(5), 447-457. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.007.
- Martin-Sosa, S., Martin, M.J., and Hueso, P. (2002). The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J Nutr* 132(10), 3067-3072.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C., Dahbi, G., et al. (2009a). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 15(6), 872-882. doi: 10.1002/ibd.20860.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., et al. (2009b). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 9, 202. doi: 10.1186/1471-2180-9-202.
- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., et al. (2001). Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* 48(3), 320-325.
- Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., and Coran, A.G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 18(7), 586-590. doi: 10.1007/s00383-002-0855-7.
- McGuckin, M.A., Linden, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9(4), 265-278. doi: 10.1038/nrmicro2538.
- McNamara, N., and Basbaum, C. (2001). Signaling networks controlling mucin production in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Glycoconj J* 18(9), 715-722.
- Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., et al. (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)* 84(12), 1055-1066. doi: 10.1007/s00109-006-0100-2.

- Moran, A.P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60(10), 1412-1425. doi: 10.1136/gut.2010.212704.
- Naughton, J.A., Marino, K., Dolan, B., Reid, C., Gough, R., Gallagher, M.E., et al. (2013). Divergent mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with mucus and mucins. *Infect Immun* 81(8), 2838-2850. doi: 10.1128/IAI.00415-13.
- Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L.A., Salazar-Gonzalez, H., and Cordova, V. (2010). Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* 78(10), 4101-4109. doi: 10.1128/iai.00523-10.
- Ng, K.M., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Lynch, J.B., Kashyap, P.C., Gopinath, S., et al. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502(7469), 96-99. doi: 10.1038/nature12503.
- Nilsson, H.E., Ambort, D., Backstrom, M., Thomsson, E., Koeck, P.J., Hansson, G.C., et al. (2014). Intestinal MUC2 mucin supramolecular topology by packing and release resting on D3 domain assembly. *J Mol Biol* 426(14), 2567-2579. doi: 10.1016/j.jmb.2014.04.027.
- Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(1), 25-38. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.001.
- Pacheco, A.R., Curtis, M.M., Ritchie, J.M., Munera, D., Waldor, M.K., Moreira, C.G., et al. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492(7427), 113-117. doi: 10.1038/nature11623.
- Palestrant, D., Holzkecht, Z.E., Collins, B.H., Parker, W., Miller, S.E., and Bollinger, R.R. (2004). Microbial Biofilms in the Gut: Visualization by Electron Microscopy and by Acridine Orange Staining. *Ultrastructural Pathology* 28(1), 23-27. doi: 10.1080/01913120490275196.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G.C., Gendler, S.J., Velcich, A., Lundberg, J.O., et al. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(2), G327-333. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2010.
- Png, C.W., Linden, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., et al. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 105(11), 2420-2428. doi: 10.1038/ajg.2010.281.
- Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., et al. (1994). Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35(3), 353-359.
- Pultz, N.J., Hoskins, L.C., and Donskey, C.J. (2006). Vancomycin-resistant *Enterococci* may obtain nutritional support by scavenging carbohydrate fragments generated during mucin degradation by the anaerobic microbiota of the colon. *Microb Drug Resist* 12(1), 63-67. doi: 10.1089/mdr.2006.12.63.
- Raouf, A.H., Tsai, H.H., Parker, N., Hoffman, J., Walker, R.J., and Rhodes, J.M. (1992). Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucin in ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 83(5), 623-626.
- Rho, J.H., Wright, D.P., Christie, D.L., Clinch, K., Furneaux, R.H., and Robertson, A.M. (2005). A novel mechanism for desulfation of mucin: identification and cloning of a mucin-desulfating glycosidase (sulfoglycosidase) from *Prevotella* strain RS2. *J Bacteriol* 187(5), 1543-1551. doi: 10.1128/jb.187.5.1543-1551.2005.
- Roos, S., and Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 148(Pt 2), 433-442.

- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., and Newburg, D.S. (2003). *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem* 278(16), 14112-14120. doi: 10.1074/jbc.M207744200.
- Sharma, R., Schumacher, U., Ronaasen, V., and Coates, M. (1995). Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36(2), 209-214.
- Sheng, Y.H., Hasnain, S.Z., Florin, T.H., and McGuckin, M.A. (2012). Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 27(1), 28-38. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06909.x.
- Slizova, M., Nemcova, R., Mad'ar, M., Hadryova, J., Gancarcikova, S., Popper, M., et al. (2015). Analysis of biofilm formation by intestinal *lactobacilli*. *Can J Microbiol* 61(6), 437-446. doi: 10.1139/cjm-2015-0007.
- Smirnova, M.G., Guo, L., Birchall, J.P., and Pearson, J.P. (2003). LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* 221(1), 42-49.
- Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam, D.N., et al. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 141(7), 1241-1252. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.005.
- Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.H., Westover, B.P., Weatherford, J., et al. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307(5717), 1955-1959. doi: 10.1126/science.1109051.
- Sperandio, B., Fischer, N., Joncquel Chevalier-Curt, M., Rossez, Y., Roux, P., Robbe Masselot, C., et al. (2013). Virulent *Shigella flexneri* affects secretion, expression, and glycosylation of gel-forming mucins in mucus-producing cells. *Infect Immun* 81(10), 3632-3643. doi: 10.1128/IAI.00551-13.
- Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* 62(5), 762-769. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., and Herber, A. (2009). Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 6, 61-71.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L.P. (2005a). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 11(8), 1131-1140.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005b). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43(7), 3380-3389. doi: 10.1128/jcm.43.7.3380-3389.2005.
- Szabady, R.L., Yanta, J.H., Halladin, D.K., Schofield, M.J., and Welch, R.A. (2011). TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins. *Microbiology* 157(Pt 2), 516-525. doi: 10.1099/mic.0.044529-0.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M.L., Gaertner, K., and Von Engelhardt, W. (1990). Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem J* 22(9), 491-497.
- Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., and Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* 69(12), 7937-7940. doi: 10.1128/iai.69.12.7937-7940.2001.
- Theodoropoulos, G., and Carraway, K.L. (2007). Molecular signaling in the regulation of mucins. *J Cell Biochem* 102(5), 1103-1116. doi: 10.1002/jcb.21539.

- Trabucchi, E., Mukenge, S., Baratti, C., Colombo, R., Fregoni, F., and Montorsi, W. (1986). Differential diagnosis of Crohn's disease of the colon from ulcerative colitis: ultrastructure study with the scanning electron microscope. *Int J Tissue React* 8(1), 79-84.
- Troge, A., Scheppach, W., Schroeder, B.O., Rund, S.A., Heuner, K., Wehkamp, J., et al. (2012). More than a marine propeller--the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int J Med Microbiol* 302(7-8), 304-314. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.09.004.
- Tu, Q.V., McGuckin, M.A., and Mendz, G.L. (2008). *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *J Med Microbiol* 57(Pt 7), 795-802. doi: 10.1099/jmm.0.47752-0.
- van der Waaij, L.A., Harmsen, H.J., Madjipour, M., Kroese, F.G., Zwiers, M., van Dullemen, H.M., et al. (2005). Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 11(10), 865-871.
- Vimal, D.B., Khullar, M., Gupta, S., and Ganguly, N.K. (2000). Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Mol Cell Biochem* 204(1-2), 107-117.
- Vogt, S.L., Pena-Diaz, J., and Finlay, B.B. (2015). Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34, 106-115. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.002.
- Weiss, A.A., Babyatsky, M.W., Ogata, S., Chen, A., and Itzkowitz, S.H. (1996). Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J Histochem Cytochem* 44(10), 1161-1166.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., et al. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 11, 61. doi: 10.1186/1741-7007-11-61.
- Wurpel, D.J., Totsika, M., Allsopp, L.P., Hartley-Tassell, L.E., Day, C.J., Peters, K.M., et al. (2014). F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* are expressed at low temperature and recognise Galbeta1-3GlcNAc-containing glycans. *PLoS One* 9(3), e93177. doi: 10.1371/journal.pone.0093177.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., et al. (2003). A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299(5615), 2074-2076. doi: 10.1126/science.1080029.
- Xue, Y., Zhang, H., Wang, H., Hu, J., Du, M., and Zhu, M.J. (2014). Host inflammatory response inhibits *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to gut epithelium through augmentation of mucin expression. *Infect Immun* 82(5), 1921-1930. doi: 10.1128/iai.01589-13.
- Ye, J., Song, L., Liu, Y., Pan, Q., Zhong, X., Li, S., et al. (2015). Core 2 Mucin-Type O-Glycan Is Related to EPEC and EHEC O157:H7 Adherence to Human Colon Carcinoma HT-29 Epithelial Cells. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-015-3548-5.
- Zarepour, M., Bhullar, K., Montero, M., Ma, C., Huang, T., Velcich, A., et al. (2013). The mucin Muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun* 81(10), 3672-3683. doi: 10.1128/iai.00854-13.



### **Résultats non publiés**

Mise au point d'une méthode de conditionnement d'un milieu de culture contenant du mucus par *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt).

## **Introduction :**

*Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt) est une bactérie anaérobie stricte présente dans le microbiote intestinal qui possède une activité mucolytique importante. Elle a été sélectionnée pour nos expériences en raison de sa grande quantité d'enzymes spécifiques aux mucus et de son effet répertorié sur la virulence et la colonisation de certains *E. coli* (Iversen et al., 2015; Le Bihan et al., 2017). Le NAG est présent dans le mucus et se retrouve donc dans l'environnement intestinal. Il peut être relâché du mucus par des bactéries mucolytiques tel que Bt.

## **Méthodologie :**

**Conditionnement du milieu de culture par Bt :** La souche Bt VPI-5482 fut utilisée et le mucus provenait de mucine gastrique de porc, procuré chez Sigma-Aldrich. Bt était cultivée dans le milieu BHIS avec ou sans mucus (1%), sous des conditions anaérobiques, à 37°C tel que décrit dans (Cordonnier et al., 2016). Les temps de conditionnement sélectionnés étaient de 6, 16 et 24 heures. Une fois le milieu conditionné, celui-ci était centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes puis filtré à l'aide de filtre 0.22µm. Le protocole fut adapté de (Iversen et al., 2015).

**Formation de biofilm de la souche LF82 en milieu conditionné :** Le milieu conditionné par Bt était mélangé dans un ratio 1:1 avec du LB frais. Une culture en LB de LF82 était diluée selon un ratio 1:100 dans le mélange de milieu. Un volume de 150 µl était ensuite déposé en triplicata dans une plaque 96 puits pour évaluer la formation de biofilm tel que décrit dans la section méthodologie et résultats. La plaque était incubée à 30°C pendant 24h. Les biofilms étaient ensuite lavés au PBS, colorés au cristal violet (0.1%, m/v) puis révélés à l'aide d'une solution d'éthanol/acétone (70%, v/v). L'absorbance à 595 nm était ensuite mesurée.

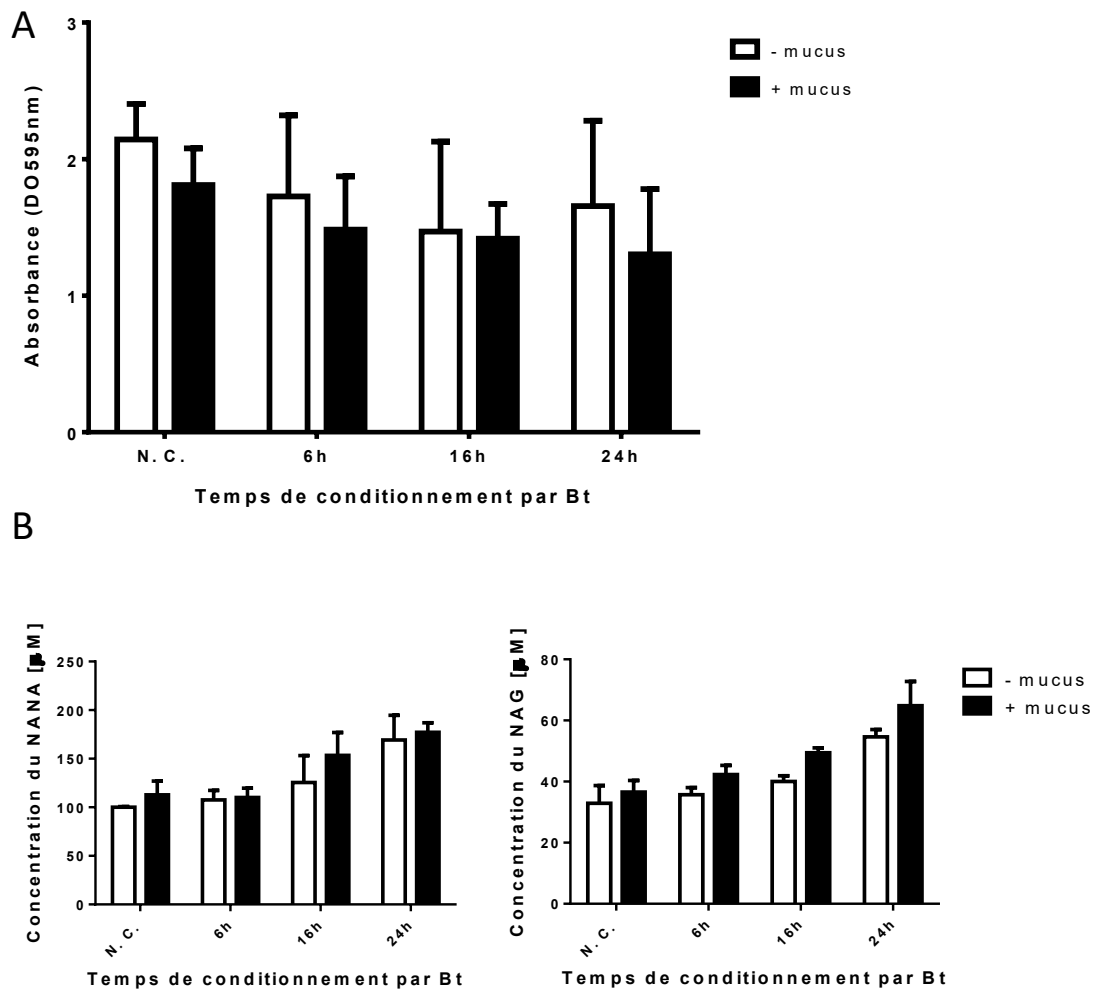
**Mesure de la concentration du NAG et du NANA dans le milieu conditionné par Bt :** La concentration des sucres fut mesurée par chromatographie en phase liquide à haute

performance couplé à la spectrométrie de masse tel que décrit dans (Le Bihan et al., 2017). Brièvement, 50µl du mélange milieu conditionné/milieu LB ont été mélangés avec 500µl de solution standard interne (100µM de produits marqués à l'isotope stable de NANA et de NAG). Les échantillons étaient alors vortexés et centrifugés à 12,000 g pour 10 minutes. Ensuite, 200µl étaient transférés dans le flacon d'injection et 10µl étaient injectés avec un Perkin Elmer Series 200 HPLC (Shelton, CT) dans une colonne (5 µm) Thermo Biobasic C18 5 x 1 mm à un débit de 100µl/min. La phase mobile était constituée d'un mélange de méthanol et de 20mM d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium selon un ratio 1:1. Le spectromètre de masse couplé au système permettait ensuite la mesure de la concentration des sucres à l'aide du ratio masse/charge.

### **Résultats :**

#### **La présence de mucus et le conditionnement par Bt n'affectent pas la formation de biofilm de LF82.**

L'ajout de NAG à une concentration de 1mM réduit la formation de biofilm de la souche LF82 en milieu LB (Fig. Résultats 1). Le conditionnement du milieu BHIS par Bt provoque une tendance à la baisse de la formation de biofilm de LF82. La présence de mucus semble également réduire la formation de biofilm de LF82, mais de façon non significative (Fig. Annexe 2A). La concentration du NANA est augmentée suite au conditionnement par Bt indépendamment de la présence de mucus (Fig. Annexe 2B). Ceci indique que Bt relâche du NANA dans le milieu BHIS avec et sans mucus. La concentration de NAG quant à elle semble être augmentée par le conditionnement de Bt ainsi que par la présence de mucus. Toutefois, la concentration du NAG (Fig. Annexe 2B) reste en deçà de celle nécessaire pour réduire la formation de biofilm tels que testés dans les conditions de l'article.



**Figure 2. La formation de biofilm de la souche AIEC LF82 dans un milieu avec ou sans mucus et conditionné par Bt.** Les biofilms ont été effectués en plaque de polystyrène et incubés à 30°C pendant 24h. Le milieu de culture avec ou sans mucus (1%) était préalablement conditionné par Bt. Les biofilms ont été colorés au cristal violet et l'absorbance à 595 nm a été mesurée. Les résultats sont la moyenne + SEM d'au moins 3 réplicats biologiques (A). La concentration des sucres a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse. Les résultats sont la moyenne + SEM (B).

## Discussion :

La formation de biofilm est un processus complexe qui implique plusieurs composants. Différents facteurs environnementaux, incluant le milieu de culture, peuvent influencer les biofilms. Le milieu conditionné par Bt était un milieu riche auquel du mucus était ajouté. Bt possède plusieurs hydrolases de glycosides qui lui permettent de libérer des monosaccharides du mucus. Par contre, il est possible que dans le milieu de culture choisi, l'activité mucolytique de Bt ne soit pas optimale. Le milieu étant riche, il est probable que Bt ne produise pas les enzymes nécessaires à la dégradation du mucus. L'utilisation d'un milieu minimal contenant du mucus lors du conditionnement pourrait potentiellement permettre une activation accrue des locus d'utilisation de polysaccharide de Bt (Martens et al., 2008). Bt a été sélectionné pour nos essais préliminaires, mais le conditionnement de milieu contenant du mucus par cette bactérie mucolytique ne semble permettre une libération optimale de sucre tel que le NAG. *A. muciniphila* aurait également pu être un candidat de choix pour cette étude. En plus d'être reconnue pour sa capacité à dégrader la mucine provenant du porc, son abondance est réduite au niveau intestinal de patients atteints de IBD (Png et al., 2010).

## Références :

- Cordonnier, C., Le Bihan, G., Emond-Rheault, J.G., Garrivier, A., Harel, J., and Jubelin, G. (2016). Vitamin B12 Uptake by the Gut Commensal Bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* Limits the Production of Shiga Toxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)* 8(1). doi: 10.3390/toxins8010014.
- Iversen, H., Lindback, T., L'Abée-Lund, T.M., Roos, N., Aspholm, M., and Stenfors Arnesen, L. (2015). The gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* influences the virulence potential of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O103:H25. *PLoS One* 10(2), e0118140. doi: 10.1371/journal.pone.0118140.
- Le Bihan, G., Sicard, J.F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A.P., Garrivier, A., et al. (2017). The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 134. doi: 10.3389/fcimb.2017.00134.
- Martens, E.C., Chiang, H.C., and Gordon, J.I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 4(5), 447-457. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.007.

Png, C.W., Linden, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., et al. (2010).  
Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of  
mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 105(11), 2420-2428. doi: 10.1038/ajg.2010.281.