



HAL
open science

Production de Shiga-toxine Stx2 par les Escherichia coli entérohémorragiques: influence du génotype stx2, régulation par le quorum sensing et le microbiote intestinal

Saltet de Sablet Thibaut

► **To cite this version:**

Saltet de Sablet Thibaut. Production de Shiga-toxine Stx2 par les Escherichia coli entérohémorragiques: influence du génotype stx2, régulation par le quorum sensing et le microbiote intestinal. Biochimie [q-bio.BM]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT: . tel-00509224

HAL Id: tel-00509224

<https://theses.hal.science/tel-00509224>

Submitted on 10 Aug 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Thèse
Présentée à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITE

Mention Génétique et Physiologie Moléculaires
Spécialité Microbiologie

Soutenance le 20 Décembre 2007
par

SALTET DE SABLET THIBAUT

PRODUCTION DE SHIGA-TOXINE STX2 PAR LES *ESCHERICHIA
COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES : INFLUENCE DU GENOTYPE
STX2, REGULATION PAR LE QUORUM SENSING ET LE
MICROBIOTE INTESTINAL

Président: M FONTY G., Directeur de Recherche, CNRS, Clermont-Ferrand

Rapporteurs: Mme LE BOUGUENEC C., Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Paris
Mme DOREL C., Maître de Conférence, INSA, Lyon

Membres: Mme DAIGLE F., Professeure, Université de Montréal, Québec
Mme MARTIN C., Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand.

Unité de Microbiologie
INRA-C.R. de Clermont-Ferrand Theix
63122 Saint-Genès Champanelle

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand. Bien qu'elle représente avant tout un travail scientifique ~~acharné (si si...)~~, elle a constitué aussi en un peu plus de 3 années d'échanges amicaux et est devenue ainsi une grande aventure humaine.

Je remercie tout d'abord le Dr Evelyne Forano, notre bien aimée directrice d'Unité pour m'avoir accueilli lors de mon DEA et pour ne pas m'avoir viré à la fin de celui-ci...

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à ma directrice de thèse Christine Martin, pour m'avoir tout au long de ces quatre années, soutenu, épaulé, encadré supporté, poussant même l'abnégation au point de m'accueillir dans son bureau... Merci à toi pour m'avoir prodigué tous ces précieux conseils techniques et scientifiques. Merci de ta grande patience à mon égard, et merci de m'avoir engueulé quand il le fallait. Merci de m'avoir aidé à surmonter les difficultés qui ont émaillé cette période. Je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi... (~~ça se paiera...~~)

Merci à Chantal Le Bouguenec et Corinne Dorel d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et de juger mon travail dans des délais un peu courts. Merci à France Daigle d'être venue d'aussi loin pour me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Merci enfin à Gérard Fonty d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci à toute l'équipe « patho » : Annie et Alex pour leur précieuse et efficace aide technique et sans qui ma thèse n'aurait probablement pas avancé comme elle l'a fait. Merci d'avoir accepté avec le sourire de faire des manips un peu à l'arrache il faut bien le reconnaître... Merci à Jean-Pierre pour tous les précieux conseils techniques qu'il m'a donnés ainsi que toutes les discussions scientifiques qui ont permis l'avancée de mes travaux. Et non tu n'es pas vieux !!! (mais quand même utiliser une règle à calcul !!). Alain, merci à toi pour tous tes conseils pour la rédaction des articles merci pour avoir accepté de relire une partie de cette thèse. Merci pour avoir été si nul au foot que j'ai eu une place de titulaire dans l'équipe. En revanche, je ne te remercie pas pour toutes les vanes minables que tu as sorties à ma place mais grâce à toi mes blagues ont paru moins lourdes... Un grand merci à Marjolaine pour ne pas m'avoir laissé tomber lorsque nous étions en Australie, merci de ta bonne humeur et bon courage pour la fin de ta thèse (PS tu as de beaux cheveux *L'oréal*TM...). Merci à Maurice pour les conseils scientifiques qu'il m'a donnés. Enfin merci à Fahima et à Yolande pour leur soutien et l'aide précieuse qu'elles ont su m'offrir.

Un grand merci aux membres de l'équipe « Eco Dig » Annick et Christophe C. pour m'avoir encadré et pour avoir participé activement au travail sur la flore humaine. Merci pour votre aide précieuse lors du travail en anaérobiose, merci pour leurs précieux avis scientifiques, en attendant la publi...

Merci à Pascale pour son soutien et son aide technique et scientifique concernant le développement de l'outil PCRq. ☺

Concernant cette équipe je voudrais ajouter quelques mots à l'intention de Minou, Coco, grande Bibiche, Caro, Delmas et Fohet. Merci à elles (désolé Minou) de faire en sorte que l'ambiance du labo soit celle d'une super cour de récré et d'avoir accepté que je devienne leur meilleure copine... (trop coooooool !!!).

Merci à Frédéric et Noémie, les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer mais qui eux n'en ont pas eu à m'avoir comme encadrant. Merci à eux ne pas s'être découragés et bon

courage pour la suite de leur cursus. S'ils décident de faire une thèse, ils ne pourront pas dire qu'ils n'étaient pas au courant...

Merci aux généreux donateurs (qu'ont-ils donné déjà ???) dont par pudeur, je ne citerai que les initiales A. P. G., A. G. junior, A. A. et C. Gaudichet (pardon...). Sans eux je n'y serai jamais arrivé.

Merci à Jean-Francois Martin pour ses précieux conseils et le temps passé à m'expliquer les subtilités des tests statistiques.

Merci à Brigitte et à Stéphanie pour leur aide précieuse dans la mise en page de ce document.

Merci à tous ceux de l'unité que je n'ai pas personnellement cités mais qui ont permis que cette thèse reste gravée comme un excellent souvenir.

Merci à tous ceux que j'ai eu l'occasion de croiser tout au long de ces quatre années lors d'activités scientifiques ou moins scientifiques.

Et enfin je voudrais remercier plus particulièrement Marion pour son soutien sans faille tout au long de cette thèse. Sans elle, cette période aurait été moins rose...

Longue vie à tous...

"The bird a nest, the spider a web, man friendship" William Blake

PUBLICATIONS

Gobert A.P., Coste A., Guzman C.A., Vareille M., Hindré T., **de Sablet T.**, Girardeau J.P. and Martin C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origin and serotypes. *Microbes Infect.*, in press.

de Sablet T., Bertin Y., Vareille M., Girardeau J.P., Garrivier A., Gobert A.P. and Martin C. Differential expression of *stx2* variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to serotypes A and C. *Microbiology*, in press.

Vareille M., **de Sablet T.**, Hindré T., Martin C. and Gobert A.P. (2007) Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PNAS* 104 (24): 10199-10204.

Gobert A.P., Vareille M., Glasser A.L., Hindré T., **de Sablet T.** and Martin C. (2007) Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NFκB Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol*; 178 (12):8168-74.

COMMUNICATIONS ORALES

de Sablet T., Chassard C., Gobert A.P., Bernalier-Donadille A. and Martin C. (2007). Influence de la microflore intestinale humaine sur la production de Shiga toxine Stx2 par les *Escherichia coli* entérohémorragiques O157 :H7. **VIIème Congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France.**

Vareille M., **de Sablet T.**, Garrivier A., Martin C., Gobert A.P. (2007) Modulation par les *Escherichia coli* entérohémorragiques de la production de monoxyde d'azote par les cellules épithéliales du côlon humain. **VIIème Congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France.**

Vareille M., **de Sablet T.**, Durand A., Martin C. and Gobert A.P. (2006) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibit nitric oxide synthesis by activated human intestinal epithelial cells. *INRA-RRI Gut Microbiology 2006: 5th Biennial Meeting, Aberdeen, Scotland.*

Vareille M., Glasser A.L., **de Sablet T.**, Martin C. and Gobert A.P. (2007) Inhibition of nitric oxide production in human intestinal epithelial cells by enterohemorrhagic *Escherichia coli* results in increased Shiga-toxin synthesis. **GREMI, Paris, France.**

Vareille M., **de Sablet T.**, Martin C. and Gobert A.P. (2006) Analyse des interactions entre le monoxyde d'azote et les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine. **Congrès Jeunes Chercheurs du Club NO, Paris, France.**

de Sablet T., Bertin Y., Gobert A.P., Girardeau J.P. and Martin C. (2006) Production de Stx2 par les *Escherichia coli* pathogènes : analyse transcriptionnelle, sécrétion et activité. **Journées de l'école doctorale Science du Vivant, Clermont-Ferrand, France.**

de Sablet T., Bertin Y., Gobert A.P., Girardeau J.P. and Martin C. (2005). Production de Shiga-toxine par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine. **2^{ème} rencontre des microbiologistes du pôle clermontois, Clermont-Ferrand, France.**

COMMUNICATIONS AFFICHEES

de Sablet T., Chassard C., Gobert A.P., Bernalier-Donadille A. and Martin C. (2006) Influence du microbiote intestinal humain sur la production de toxine Stx2 par les *E coli* O157 : H7. **Journée de l'Institut Fédératif de Recherche Santé Auvergne, Clermont-Ferrand, France.**

de Sablet T., Bertin Y., Gobert A.P., Girardeau J.P. and Martin C. (2006) Transcriptional analysis, release and specific activity of Stx2 in Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. (VTEC 2006) **6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne, Australia.**

Vareille M., Durand A., **de Sablet T.**, Martin C. and Gobert A.P. (2006). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibit Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Intestinal Epithelial Cells. (VTEC 2006) **6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections, Melbourne, Australia.**

Vareille M., Durand A., **de Sablet T.**, Martin C. and Gobert A.P. (2006). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibit iNOS expression in activated human intestinal epithelial cells. Abstract in Nitric Oxide: Biol Chem (2006) 14: A18. **Fourth International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Monterey, USA.**

de Sablet T., Bertin Y., Gobert A.P., Girardeau J.P. and Martin C. (2006) Synthèse de Shiga toxine 2 par *Escherichia coli* et relation avec la pathogénicité des isolats. **Rencontre des microbiologistes de l'INRA, Dourdan, France.**

de Sablet T., Bertin Y., Gobert A.P., Girardeau J.P. and Martin C. (2006) Stx2 synthesis in pathogenic *Escherichia coli*: Transcriptional analysis, secretion and activity. **INRA-RRI Gut Microbiology 2006: 5th Biennial Meeting, Aberdeen, Scotland.**

Gobert A.P., Besson C., Durand A., **de Sablet T.** and Martin C. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* stimulate inducible nitric oxide synthase in human colonic epithelial cells. **IUMS 2005: Microbes in a changing world, San Francisco, USA.**

de Sablet T., Bertin Y., Girardeau J.P. and Martin C. (2005) Comparaison de la production de Shiga-toxine par les STEC d'origine humaine et bovine. **Journées du département de santé animale, Batz-sur-mer, France.**

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	13
REVUE DE LITTERATURE.....	17
1 - CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A EHEC.....	20
1-1. ASPECTS CLINIQUES.....	20
1-1.1. Symptomatologie.....	20
1-1.2. Traitements.....	21
1-2. EPIDEMIES ET CAS SPORADIQUES D'INFECTION.....	21
1-2.1. Les épidémies.....	21
1-2.2. Les cas sporadiques.....	23
1-3. RESERVOIRS ET VECTEURS.....	25
1-4. SOURCES D'INFECTION.....	26
1-5. PHYLOGENIE DES STEC, CLASSIFICATION EN SEROPATHOTYPES.....	28
1-5.1. Phylogénie de <i>E. coli</i>	28
1-5.2. Origine et phylogénie des EHEC.....	28
1-5.3. Classification des STEC en séropathotypes.....	31
2 - PHYSIOPATHOLOGIE.....	32
2-1. RESISTANCE A L'ACIDITE GASTRIQUE.....	32
2-2. COLONISATION INTESTINALE: LES FACTEURS D'ADHESION.....	33
2-2.1. Le Locus d'Effacement des Entérocytes (LEE).....	34
2-2.2. Les autres facteurs d'adhésion.....	39
2-3. REPOSE INFLAMMATOIRE INDUITE PAR LES EHEC.....	40
2-4. AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE.....	42
2-4.1. L'entérohémolysine.....	42
2-4.2. La sérine protéase EspP.....	43
2-4.3. La toxine CDT.....	43
2-4.4. La subtilase.....	43

3 - LES SHIGA-TOXINES	44
3-1. STRUCTURE DES SHIGA TOXINES	45
3-2. ROLE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE	46
3-2.1. Action sur l'épithélium intestinal	46
3-2.2. Action sur l'endothélium	48
3-3. LES DIFFERENTS VARIANTS	50
3-3.1. Description	50
3-3.1.1. Stx1	50
3-3.1.2. Stx2	50
3-3.2. Association des variants Stx avec les manifestations cliniques des infections à EHEC	51
3-3.3. Toxicité des variants	52
3-4. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES <i>STX</i>	53
3-4.1. La réponse SOS	54
3-4.2. Influence de la concentration en fer	57
4 - LE MICROBIOTE COLIQUE HUMAIN.....	58
4-1. STRUCTURE DU MICROBIOTE COLIQUE	58
4-1.1. Biodiversité et composition de la flore colique	58
4-1.2. Etablissement et variation de la flore colique	60
4-1.2.1. Etablissement de la flore colique	60
4-1.2.2. Variation de la flore colique au cours du temps	60
4-1.2.3. Variation de la flore en fonction du site colique	61
4-1.2.4. Variation de la flore colique en fonction de l'alimentation	61
4-2. FONCTIONS DU MICROBIOTE HUMAIN	61
4-2.1. Fermentations	62
4-2.2. Synthèse de vitamines	63
4-2.3. Induction de l'angiogénèse du tube digestif	63
4-2.4. Rôle dans la protection de l'hôte	63
4-2.4.1. Effet barrière	63
4-2.4.2. Développement de l'immunité	66
4-2.4.3. Homéostasie de la réponse inflammatoire	66
4-3. INFLUENCE DES BACTERIES COMMENSALES ET PROBIOTIQUES LORS D'INFECTIONS A EHEC	70
4-3.1. Effet des <i>E. coli</i> commensaux	70

4-3.2. Effet des probiotiques lors d'infections par les EHEC.....	71
4-3.2.1. Impact des probiotiques sur la colonisation des EHEC et la production de Shiga-toxine	72
4-3.2.2. Impact des probiotiques sur la réponse immunitaire lors d'infections à EHEC.....	73
5 - LE QUORUM SENSING.....	73
5-1. LES SYSTEMES DE QUORUM SENSING CHEZ LES BACTERIES A GRAM ⁻	74
5-1.1. Le système HomoSérineLactone/LuxR.....	74
5-1.2. Le système LuxS/AI-2.....	75
5-1.3. Le système AI-3/épinéphrine/norépinéphrine	77
5-2. LE QUORUM SENSING CHEZ LES EHEC.....	79
5-2.1. Régulation du flagelle.....	80
5-2.2. Régulation de la formation des lésions d'attachement effacement	81
5-2.2.1. Régulation de l'expression du LEE.....	81
5-2.2.2. Régulation de l'expression de <i>EspFu</i>	82
5-2.2.3. Régulation de <i>Stx2</i>	83
MATERIEL ET METHODES	85
Souches utilisées.....	87
Construction de mutants	87
Milieux et conditions de culture	89
Mesure de l'activité cytotoxique envers les cellules Vero	90
Echantillons fécaux	91
Obtention des rats à flore humaine.....	92
Conditionnement des milieux.....	92
Extraction de l'ADN génomique des STEC.....	93
Typage des variants <i>stx2</i>	93
Dosage de la toxine <i>Stx2</i> par ELISA.....	94
Extraction des ARN.....	95
Transcription inverse des ARN en ADNc	96
PCR quantitative.....	97
Obtention des courbes standard.....	97
Quantification des ADNc <i>stx2</i> et <i>recA</i>	98
Quantification des particules phagiques	98
Analyses statistiques.....	99
Dot-Blot <i>Stx2</i>	99
Dosages de l'AI-3	100
RESULTATS.....	101

CHAPITRE 1 EXPRESSION DES GENES <i>STX2</i> DANS DES SOUCHES STEC DE SEROPATHOTYPE A ET C.....	103
1 - CARACTERISATION DES VARIANTS <i>STX2</i>.....	103
2 - CYTOTOXICITE ENVERS LES CELLULES VERO.....	108
3 - PRODUCTION DE PHAGES <i>STX2</i>	112
3-1. ETUDE DE LA SENSIBILITE DES STEC A LA MITOMYCINE C PAR CINETIQUE DE CROISSANCE	112
3-2. QUANTIFICATION DES PHAGES <i>STX2</i>	114
3-2.1. Isolement des particules phagiques	114
3-2.2. Choix des amorces.....	115
3-2.3. Génération des courbes standard	115
3-2.4. Résultats	115
4 - ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES VARIANTS <i>STX2</i>.....	117
5 - CORRELATION ENTRE L'EXPRESSION DES GENES <i>STX2</i> ET LA PRODUCTION DE PHAGES <i>STX2</i>	120
6 - PRODUCTION DE <i>STX2</i>	121
DISCUSSION	125
CONCLUSION	130
CHAPITRE 2 REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>STX2</i> PAR LES POLYAMINES ET LE QUORUM SENSING.....	131
1 - EFFET DES POLYAMINES.	131
2 - IMPLICATION DU QUORUM SENSING	134
DISCUSSION	141
CHAPITRE 3 INFLUENCE DU MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN SUR LA SYNTHÈSE DE <i>STX2</i>	144
1 - RATS A MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN.....	144
1-1. CROISSANCE DE LA SOUCHE EDL 933 DANS LES MILIEUX HMC ET GFC.	146
1-2. SYNTHÈSE DE <i>STX2</i> DANS LES MILIEUX HMC ET GFC.....	146
2 - MILIEU CC CONDITIONNE PAR LE MICROBIOTE FECAL HUMAIN.....	148

2-1. SYNTHÈSE DE STX2 DANS LE MILIEU CC	148
2-2. EXPRESSION DE <i>RECA</i> DANS LE MILIEU CC	150
2-3. INFLUENCE DU MICROBIOTE SUR LA SYNTHÈSE DE STX2 EN CONDITIONS INDUITES.....	150
3 - CARACTÉRISATION DES ESPÈCES BACTÉRIENNES RESPONSABLES DE L'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE STX2.	152
4 - IDENTIFICATION DE LA FRACTION INHIBITRICE.	154
5 - EFFET DU QUORUM SENSING	155
DISCUSSION.....	158
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
ANNEXES	203
PUBLICATIONS	213

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
A/E	Attachement/effacement
AGCC	Acides gras à chaînes courtes
AI-1	Auto inducteur 1
AI-2	Auto inducteur 2
AI-3	Auto inducteur 3
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
CD ₅₀	cytotoxique dose 50 (quantité de toxine provoquant la lyse de 50% des cellules Vero)
CEI	cellule épithéliale intestinale
DO	Densité optique
EAEC	Enteroagregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohémorragique <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogène <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigène <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extra intestinal <i>Escherichia coli</i>
GFC	Germ-free caecum
HMC	Human microbiota caecum
HSL	Homo sérine lactone
LDH	Lactate déshydrogénase
LEE	Locus d'effacement des enterocytes
LPS	Lippopolysaccharide
MC	Mitomycine C
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglycane
PMN	Neutrophiles polymorphonucléaires

PTT	Purpura thrombotique thrombocytopénique
SEM	Standard error of the mean (erreur standard à la moyenne)
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
SSTT	Système de sécrétion de type trois
STEC	Shiga toxin producing <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga toxine
TLR	Toll-like receptors
ufc	Unités formant colonies
wt	Wild-type (souche sauvage)

Note : la nomenclature des variants *stx2* peut porter à confusion, puisqu'on parle de *stx2* pour nommer de façon générique les gènes codant pour la Shiga toxine de type 2, mais aussi pour parler du variant *stx2* initialement décrit dans la souche de référence EDL 933. Pour éviter cette confusion, j'ai écrit *stx₂* (le 2 en indice) lorsque je parle du variant, et *stx2* lorsque je parle du type générique.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Evolutions cliniques après ingestion des EHEC	20
Figure 2 : Proportion d'isolats non-O157 vs O157 lors d'infections par les STEC dans les pays du réseau Enter-net pour la période 2000-2004.	23
Figure 3 : Distribution par mois du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans durant la période 1996-2006.	24
Figure 4 : Distribution par âge du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans durant la période 1996-2005.	25
Figure 5 : Diversité clonale des STEC isolés de patients.	30
Figure 6 : Modèle de l'émergence de <i>E. coli</i> O157.	31
Figure 7 : Phénotype d'adhésion intime.	34
Figure 8 : Lésions d'attachement-effacement induites par une souche <i>E. coli</i> O157:H7 sur des cellules rectales de mouton.	35
Figure 9 : Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes. Les couleurs des flèches indiquent la fonction des gènes correspondants.	35
Figure 10 : Schéma du Système de Sécrétion de Type III (SSTT) des EHEC.	36
Figure 11 : Liaison intimine-récepteur.	37
Figure 12 : Figure 12: Modèle de régulation de l'expression du LEE.	38
Figure 13 : Physiopathologie des infections à EHEC.	44
Figure 14 : Représentation tridimensionnelle de la Shiga-toxine 2.	45
Figure 15 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines.	48
Figure 16 : Internalisation et transport de la Shiga-toxine de la membrane apicale vers le cytosol.	49
Figure 17 : Représentation schématique des régions précoces et tardives des phages 933W (<i>stx2</i>), H19B (<i>stx1</i>) et lambda.	54
Figure 18 : Induction de la réponse SOS bactérienne.	55
Figure 19 : structure du phage 933W portant les gènes <i>stx2</i>	56
Figure 20 : Densité bactérienne dans le tube digestif humain et principaux genres représentés.	58
Figure 21 : Différentes actions protectrices, structurales et métaboliques exercées par le microbiote intestinal humain sur la muqueuse intestinale.	62
Figure 22 : Contributions bactériennes à l'immunité innée de l'intestin.	65

Figure 23 : Les voies de signalisation des TLR dans les cellules épithéliales intestinales (CEI).....	67
Figure 24 : Mécanismes d'inhibition de l'activation de NF- κ B.....	68
Figure 25 : Action anti-inflammatoire de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	69
Figure 26 : Mécanisme de régulation de la bioluminescence chez <i>V. fischeri</i>	74
Figure 27 : Régulation par le système LuxS/AI-2 chez <i>V. harveyi</i> et <i>E. coli</i>	75
Figure 28 : Voies de biosynthèse et d'internalisation de l'AI-2 chez <i>E. coli</i>	76
Figure 29 : Voies de biosynthèse de l'homocystéine chez <i>E. coli</i>	78
Figure 30 : Modèle de régulation par l'AI-3 de l'expression des gènes du flagelle et du LEE.....	81
Figure 31 : Alignements protéiques (A) et nucléotidiques (B) de différents variants <i>stx2</i> dont la séquence est disponible sur Genbank.....	105
Figure 32 : Caractérisation des variants <i>stx2_c</i> et <i>stx2_{vha}</i> par RFLP-PCR.....	107
Figure 33 : Répartition des différents variants <i>stx2</i> parmi les souches de sérotypage A, C et E.....	107
Figure 34 : Cytotoxicité des isolats STEC d'origine humaine (A) et bovine (B).....	109
Figure 35 : Courbes de croissance des souches STEC en présence et en absence de mitomycine C.....	113
Figure 36 : Concentration des particules phagiques <i>stx2</i> dans les surnageants de cultures à 3 h.....	116
Figure 37 : Quantification relative des ARNm <i>stx2</i>	119
Figure 38 : Quantité de Stx2 présente dans le surnageant de culture des souches STEC.....	123
Figure 39 : Production de toxine Stx2 en milieu M9 en absence et en présence de spermine à différentes concentrations en présence de mitomycine C.....	132
Figure 40 : Courbe de croissance de EDL 933 et du mutant EDL 933 Δ <i>speB</i> Δ <i>speC</i> en milieu LB en absence (A) et en présence de 250 ng/ml de mitomycine C (B).....	133
Figure 41 : Production de Stx2 par EDL 933 et le mutant EDL 933 Δ <i>speB</i> Δ <i>speC</i> en DMEM en présence de mitomycine C.....	134
Figure 42 : Présence de l'auto-inducteur 3 dans le milieu LB conditionné par la souche EHEC EDL 933.....	135
Figure 43 : Quantité de Stx2 dans le milieu LB conditionné (PC) par la souche EDL 933 et le mutant EDL 933 Δ <i>luxS</i>	136
Figure 44 : Croissance de EDL 933 et des mutants EDL 933 Δ <i>luxS</i> et EDL 933 Δ <i>qseA</i> en DMEM en absence ou en présence de mitomycine C.....	137

Figure 45 : Production de Stx2 par EDL 933 et des mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$ en DMEM en absence de mitomycine C. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.....	137
Figure 46 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de <i>stx2</i> en DMEM sans mitomycine C chez EDL 933 et les mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.....	138
Figure 47 : Quantité de toxine Stx2 produite en DMEM par la souche EDL 933 et les mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.....	138
Figure 48 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de <i>stx2</i> (A) et de <i>recA</i> (B) en milieu DMEM en présence de mitomycine C.	139
Figure 49 : Croissance de EDL 933 en DMEM supplémenté en norépinéphrine (NE).	140
Figure 50 : Quantité de toxine Stx2 produite par EDL 933 en DMEM supplémenté ou non avec 50 μ M de norépinéphrine (NE).....	140
Figure 51 : Dénombrement des différentes flores bactériennes présentes dans les fèces des rats à flore humaine 14 jours après inoculation.....	145
Figure 52 : Courbe représentative de la croissance de EDL 933 dans les milieux issus de rats axéniques ou de rats à flore humaine.....	146
Figure 53 : Synthèse de Stx2 par EDL 933 dans les milieux issus de rats.....	147
Figure 54 : Courbes de croissance représentatives de EDL 933 dans les milieux CC conditionnés ou non par les microbiotes fécaux de quatre individus différents.....	148
Figure 55 : Quantification de Stx2 dans le surnageant de culture de la souche EDL 933 dans les milieux CC conditionnés ou non par les flores fécales de quatre individus.	149
Figure 56 : Analyse transcriptionnelle du gène <i>recA</i> dans le milieu CC contrôle et conditionné.	150
Figure 57 : Analyse en Dot-Blot de la concentration de Stx2 dans les milieux CC contrôle et conditionné après 6 h et 24 h de culture.	151
Figure 58 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de <i>recA</i> dans le milieu CC contrôle et conditionné en absence et en présence de ciprofloxacine	152
Figure 59 : Production de toxine Stx2 par la souche EDL 933 en milieux CC conditionnés par certaines espèces bactériennes classiquement retrouvées dans les flores fécales.	153
Figure 60 : Production de toxine Stx2 par la souche EDL 933 en milieu CC conditionné par <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	154
Figure 61 : Production de toxine Stx2 après 24h de culture dans les milieux CC contrôle et conditionné fractionnés par ultrafiltration.	155
Figure 62 : Production de toxine Stx2 par les souches EDL 933 $\Delta qseA$ (A) et EDL 933 $\Delta qseC$ (B) dans les milieux CC contrôle ou conditionnés.	156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Identification des sérogroupes de <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxine (STEC) non-O157 impliqués dans des infections humaines dans 17 pays industrialisés sur la période 1982-2003.	19
Tableau 2 : Nombres d'épidémies et de cas sporadiques d'infection par les O157:H7 en fonction du mode de transmission. Période 1982-2002	26
Tableau 3 : Classification des STEC en sérotypotypes en fonction de la fréquence d'isolement lors d'épidémies et de la sévérité de la pathologie engendrée.....	32
Tableau 4 : Génotype <i>stx</i> des STEC et leur fréquence relative parmi les isolats cliniques de patients atteints de SHU et de diarrhées (1996-2004).	52
Tableau 5 : Comparaison de la composition des principaux genres ou groupes microbiens du côlon par les techniques de Dot-Blot et d'hybridation <i>in situ</i> (FISH).....	59
Tableau 6 : Espèces bactériennes possédant le gène <i>luxS</i>	77
Tableau 7 : Différents systèmes de quorum sensing identifiés chez les bactéries intestinales et phénotypes régulés.	79
Tableau 8 : Caractéristiques des souches STEC utilisées	88
Tableau 9 : Liste des espèces bactériennes ayant servi à conditionner le milieu CC et testées pour leur pouvoir d'inhibition de la synthèse de Stx2.	89

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine (STEC) ont été découverts il y a une vingtaine d'années. Les STEC isolés lors d'infections chez l'Homme sont appelés *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). Ils sont le quatrième agent responsable de toxi-infections alimentaires dans le monde, et la France a connu, au quatrième trimestre 2005, 2 épidémies conduisant à l'hospitalisation d'une centaine de patients majoritairement composée d'enfants. Les EHEC provoquent des pathologies intestinales qui peuvent aller de la simple diarrhée à des complications graves comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) dont le pronostic peut être fatal. Le pathovar STEC comprend des bactéries appartenant à de nombreux sérotypes différents, mais le prototype des EHEC appartient au sérotype O157:H7. La contamination par ces bactéries résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires contaminés, tels que la viande ou les fromages au lait cru. En effet, ces produits sont susceptibles d'être souillés par les fèces de bovins dont le tube digestif apparaît comme le principal réservoir naturel de ces bactéries. Le principal facteur de virulence des EHEC est une toxine apparentée à la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae*, appelée Shiga-like toxine ou Shiga toxine (Stx), qui provoque la mort des cellules endothéliales et est à l'origine des complications les plus graves de l'infection. Les STEC produisent 2 types de Shiga toxines, Stx1 et Stx2. C'est Stx2 qui apparaît le plus souvent associée aux cas de SHU. Les Shiga toxines sont codées par des gènes (*stx*) portés par des phages de type Lambda. Ainsi, l'induction du système SOS de réparation de l'ADN bactérien provoque une libération importante de Stx2 par les EHEC. Il a été montré que les EHEC produisent *in vitro* de grandes quantités de Shiga toxines, et certaines études suggèrent que la quantité de Stx2 produite dans l'intestin est corrélée à la gravité des pathologies engendrées lors de l'infection. Cependant, toutes les souches STEC ne produisent pas la même quantité de Stx2. De plus, les facteurs biotiques ou abiotiques qui influencent la production de Stx2 dans le tube digestif de l'Homme sont largement méconnus.

Une première partie de mon travail a donc consisté en l'étude de la production de toxine Stx2 *in vitro* par des souches STEC provenant de diverses origines (bovine ou clinique), appartenant à divers sérotypotypes, et codant pour différents variants Stx2. Le but de l'étude était de déterminer si la production de Stx2 pouvait être corrélée à la pathogénicité de la souche. Cette première partie a ainsi permis le développement de techniques d'analyses couramment utilisées au laboratoire depuis lors.

Peu de données sont disponibles concernant les facteurs pouvant influencer la production de Stx2 par les EHEC *in vivo*. Certaines études suggèrent que des molécules produites soit par

les cellules intestinales eucaryotes, soit par le microbiote résident, exercent une influence sur la production de Stx2. La seconde partie de mon travail a donc été d'étudier *in vitro* l'influence sur la synthèse de Stx2 de molécules présentes dans le contenu intestinal et déjà décrites comme activant le système SOS, ou comme régulant l'expression d'autres facteurs de virulence des EHEC.

L'objectif de la dernière partie de ma thèse était d'analyser la synthèse de Stx2 dans un milieu le plus représentatif possible du contenu intestinal humain, et ainsi de caractériser les facteurs environnementaux susceptibles de réguler *in vivo* la synthèse de Stx2. Pour cela, j'ai mis en place une méthodologie originale permettant de cultiver les EHEC dans un milieu proche du milieu intestinal humain, contenant à la fois les métabolites provenant de l'alimentation ou produits par l'hôte, et les métabolites produits par le microbiote résident.

REVUE DE LITTERATURE

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga toxine (STEC) ont été décrits pour la première fois en 1977 par Konowalchuk sur la base d'une activité toxique pour les cellules Vero de surnageants de cultures de certaines souches d'*Escherichia coli* isolées d'enfants atteints de diarrhées (Konowalchuk *et al.*, 1977). Dans les années 1980, les STEC ont été associés à l'apparition de cas de colites hémorragiques et de syndrome hémolytique et urémique (Karmali *et al.*, 1983a; Karmali *et al.*, 1983b). A partir de ces constatations, un nouveau pathovar de *E. coli* a été défini : les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) (Levine, 1987).

Les STEC/EHEC sont caractérisés par la combinaison O:H de leurs antigènes lipopolysaccharidiques de paroi (O) et flagellaires (H) (Kauffmann, 1947). Les STEC isolés à partir d'échantillons humains sont répartis dans plus d'une centaine de serotypes (Johnson *et al.*, 2006).

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

Tableau 1 : Identification des sérogroupe de *E. coli* producteurs de Shiga-toxine (STEC) non-O157 impliqués dans des infections humaines dans 17 pays industrialisés sur la période 1982-2003. (Johnson *et al.*, 2006)

Le sérotype le plus fréquemment isolé de cas cliniques est le sérotype O157 : H7. Il est en particulier à l'origine de la grande majorité des épidémies survenues aux Etats-Unis et au Royaume Uni. Cependant, des souches provenant d'autres sérogroupe tels que O26, O91, O103, O111, O113, O145 ont été isolées de cas cliniques (Johnson *et al.*, 2006) (tableau1).

1 - CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A EHEC

1-1. Aspects cliniques

1-1.1. Symptomatoologie

Les infections à EHEC dont la dose infectieuse est estimée à moins de 50 bactéries (Tilden *et al.*, 1996) sont caractérisées par différents symptômes dont l'apparition se fait séquentiellement dans les 15 jours suivant l'ingestion de l'aliment contaminé. Les premiers symptômes apparaissent sous forme de diarrhée aqueuse modérée entre 1 et 9 jours après ingestion (Brunton J, 1994). Dans 90% des cas, la diarrhée devient sanglante et s'accompagne de sévères douleurs abdominales spasmodiques et d'une déshydratation modérée. Cette colite hémorragique dure 2 à 10 jours généralement sans apparition de fièvre. Elle peut en revanche être accompagnée de vomissements. Des complications pouvant mettre en cause le pronostic vital apparaissent dans 10% des cas une semaine environ après le début des troubles. Ces complications, dues à la production de Shiga-toxines (Stx) diffusibles à partir des sites de colonisation, se traduisent par des microangiopathies thrombotiques de 2 types : le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) (Figure 1) (Gillis, 1996; Nivet *et al.*, 1995).

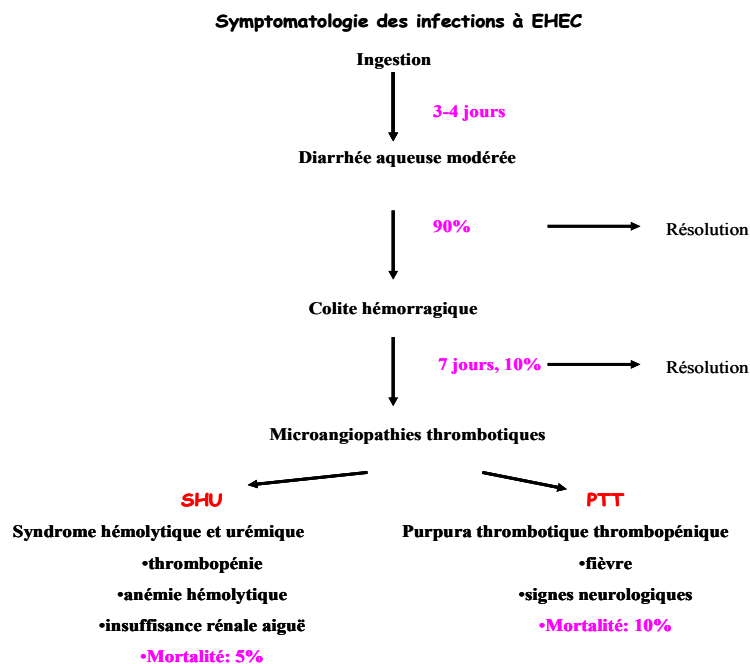


Figure 1 : Evolutions cliniques après ingestion des EHEC

Le SHU se caractérise par une anémie microangiopathique hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë. De plus certains troubles du système nerveux central tels que léthargie, convulsions et encéphalopathie ont été observés (Tesh *et al.*, 1993). Ce syndrome touche principalement les enfants de moins de 5 ans.

Le PTT présente les mêmes caractéristiques physiopathologiques que le SHU mais il diffère du SHU par le fait que les patients présentent une fièvre importante et des symptômes neurologiques plus marqués. Cette forme touche plus particulièrement les personnes âgées.

1-1.2. Traitements

Les traitements mis en place dans le cas d'une infection aux EHEC sont essentiellement symptomatiques (diurèse, hémodialyse, transfert de plasma frais) (Andreoli *et al.*, 2002). Ils permettent de diminuer la mortalité de 40 à 4% dans les cas de SHU et de 90 à 10 % dans les cas de PTT (Gillis, 1996). Cependant les séquelles sont fréquentes et durables, notamment au niveau rénal. Le taux de guérison sans séquelles est d'environ 70%.

L'antibiothérapie est très discutée. Plusieurs études montrent qu'elle n'est pas efficace (Bell *et al.*, 1997) et même peut s'avérer un facteur de risque plus important pour le développement d'un SHU (Wong *et al.*, 2000; Farquhar, 2000). A l'heure actuelle, plusieurs nouvelles thérapies sont à l'étude. L'administration d'anticorps monoclonaux anti toxine Stx semble diminuer la probabilité d'apparition de symptômes neurologiques chez le porcelet gnotobiotique. L'administration de l'agent SYNSORB Pk composé de sucres mimant le récepteur de la toxine permet de séquestrer la toxine dans la lumière intestinale et donc d'empêcher l'absorption systémique (Trachtman and Christen, 1999). L'administration de *E. coli* non pathogènes produisant des analogues structuraux du récepteur de la toxine abolit complètement l'effet d'une dose létale de O157 :H7 chez la souris (Paton *et al.*, 2000).

1-2. Epidémies et cas sporadiques d'infection

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées afin de déterminer la prévalence des infections à EHEC. Des épidémies et des cas sporadiques d'infection à EHEC ont été recensés dans de nombreuses parties du monde mais les Etats-Unis sont les premiers concernés par ce type d'infection.

1-2.1. Les épidémies

Les Etats-Unis sont les plus touchés par les épidémies d'infection par les EHEC. En effet, depuis 1982, plus d'une centaine d'épidémies impliquant les O157 ont été répertoriées aux

Etats-Unis (Armstrong *et al.*, 1996;Griffin, 1995;Rangel *et al.*, 2005). En particulier, entre 1998 et 2002, 140 épidémies dues à *E. coli* ont été comptabilisées sur l'ensemble du territoire américain et la majorité de ces épidémies étaient dues aux *E. coli* du sérotype O157:H7 (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>). Elles se développent généralement au sein des communautés : les crèches, les écoles, les centres de loisir, les prisons, etc... (Karmali, 1989), ou dans les restaurants (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>). L'une des plus importantes a touché 732 personnes dans l'état de Washington en 1993, dont 55 ont développé un SHU et 4 sont décédées (Bell *et al.*, 1994). L'âge moyen des malades était de 7 ans. L'aliment incriminé était de la viande de bœuf hachée. Une épidémie massive a touché 781 personnes en 1999 avec 14 cas de SHU et 2 décès. Elle fut attribuée à la consommation d'eau contaminée. Plus récemment, en 2006, eurent lieu 2 épidémies ; la première due à la consommation d'épinards frais contaminés toucha 204 personnes dans 25 états différents. 32 personnes développèrent un SHU et il y eut 3 morts (Maki, 2006). La seconde toucha 71 personnes dans 5 états différents. Cette épidémie a été liée à la consommation d'aliments contaminés dans les restaurants de la chaîne Taco Bell.

D'autres pays industrialisés ont aussi été gravement touchés par les infections à EHEC. Parmi eux on peut citer le Japon qui a connu la plus grande épidémie jamais répertoriée en 1996. Près de 1000 personnes ont été touchées, 101 ont développé un SHU et 8 sont décédées (Michino *et al.*, 1999). Cette épidémie est survenue dans les cantines scolaires à la suite de la consommation de pousses de radis crus contaminées et a ensuite touché les membres d'encadrement et les membres des familles d'enfants atteints.

L'Europe connaît quant à elle régulièrement des cas d'infection par les EHEC. La plus grande épidémie survenue en Europe date de novembre 1996 en Ecosse. Elle a touché 501 personnes dont 20 sont décédées. La cause de l'infection fut la consommation de viande froide contaminée par *E. coli* O157:H7 (Ahmed, 1998). Pour la période 2000-2004, il a été recensé en Europe près de 2600 cas d'infection aux STEC dans les 17 pays du réseau Enter-net. Plus de la moitié des infections était due à *E. coli* de sérotype O157:H7. 99% des cas recensés en Europe non continentale étaient en effet dus aux O157:H7 mais seulement 30% des cas étaient dus aux *E. coli* appartenant à ce sérotype en Europe continentale (figure 2) (http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_menu.htm).

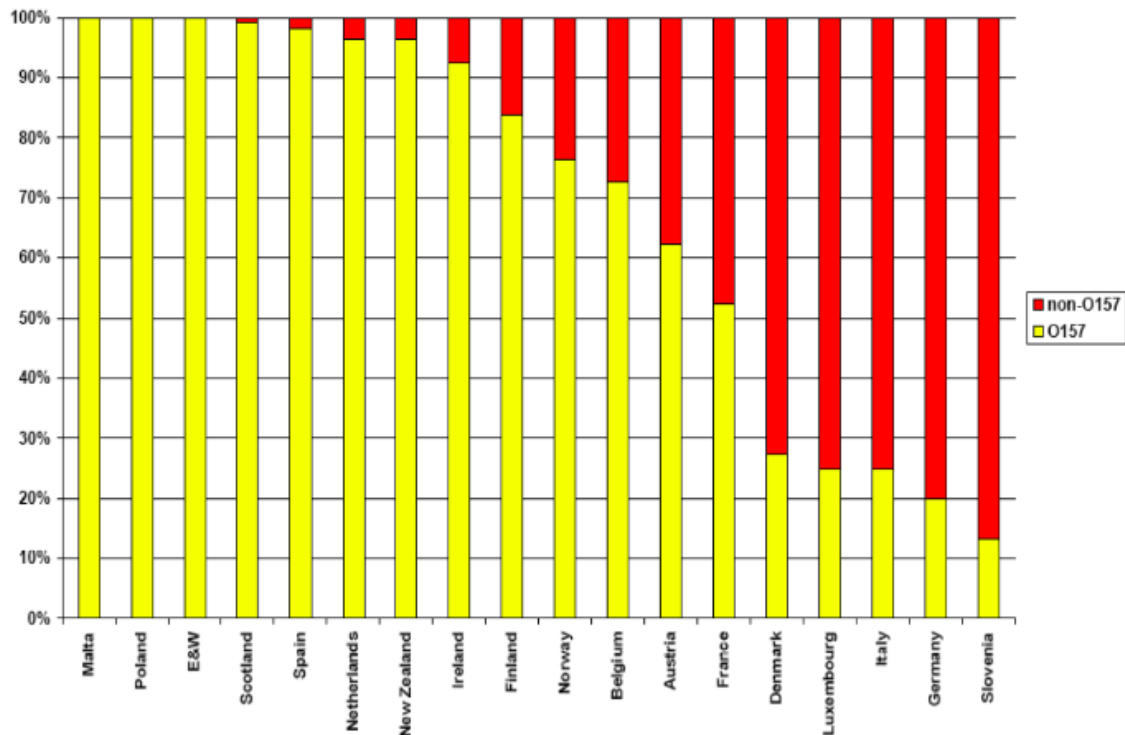


Figure 2 : Proportion d'isolats non-O157 vs O157 lors d'infections par les STEC dans les pays du réseau Enter-net pour la période 2000-2004.

La France n'a jusqu'à présent connu que deux épidémies de grande ampleur. Elles ont respectivement touché 69 et 17 personnes et ont provoqué chacune 17 cas de SHU, tous chez des enfants à l'exception de 1 cas. La première était due à la consommation de steak hachés de bœuf surgelés contaminés par des *E. coli* O157:H7 et la seconde était due à la consommation de camemberts au lait cru contaminés par des *E. coli* non O157:H7 (http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2005.pdf).

Enfin, l'Australie connaît en moyenne 49 épidémies chaque année. Ces épidémies n'excèdent que très rarement la dizaine de patients et elles ne sont en général pas dues aux EHEC de sérotype O157:H7 mais aux EHEC appartenant à des sérogroupes plus rares tels que O113 ou O111 (<http://www.foodsafetycentre.com.au>).

Des épidémies sont de plus en plus fréquemment décrites dans les pays d'Amérique du sud dans lesquels la détection se fait de plus en plus efficace.

1-2.2. Les cas sporadiques

Alors que les grandes épidémies sont souvent bien documentées, la fréquence des cas sporadiques d'infection est probablement sous-estimée. En effet, les STEC ne sont pas recherchés systématiquement chez les patients atteints de diarrhées et à l'heure actuelle il

n'existe pas de test rapide permettant la détection de souches de sérotype non O157:H7 du fait de leur grande diversité biochimique. Les formes sporadiques d'infection représenteraient pourtant la majorité des cas.

En France, aucune donnée sur l'incidence des infections à STEC n'est disponible et par conséquent le seul outil disponible est la surveillance du SHU typique chez l'enfant. En 2006, le réseau de surveillance des cas de SHU a recensé 104 cas chez les enfants de moins de 15 ans. Une tendance saisonnière a été observée depuis 1996 avec 51% de cas survenant entre Juin et Septembre (http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2006.pdf) (figure 3).

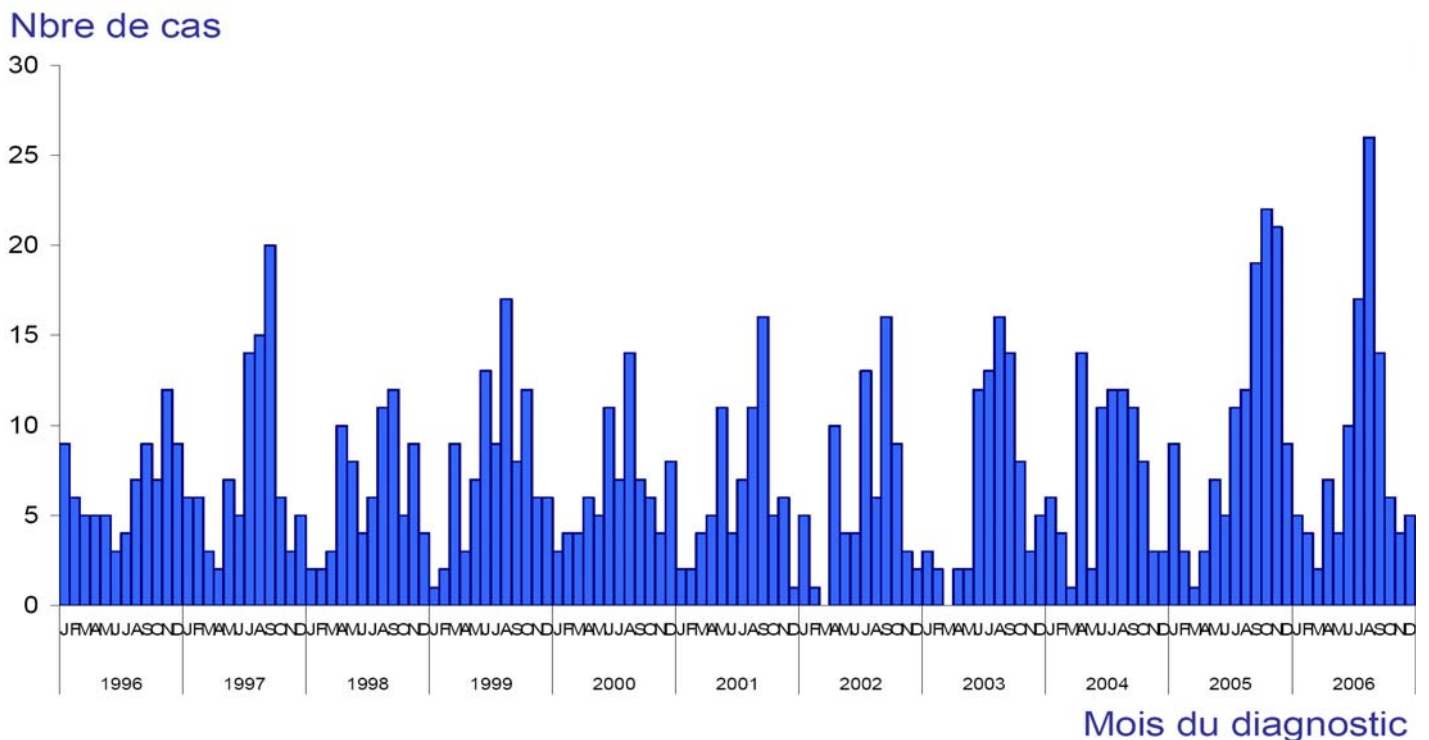


Figure 3 : Distribution par mois du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans durant la période 1996-2006.

Pour chaque année, le nombre de cas pour chaque mois est représenté par une barre.

Le taux d'incidence moyen est inférieur à 1 cas pour 10^5 enfants de moins de 15 ans et la tranche d'âge la plus touchée est celle comprise entre 1 et 3 ans (figure 4). Cette tranche d'âge présente depuis 1996 une incidence de 2,3 cas pour 100000 enfants (http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2006.pdf).

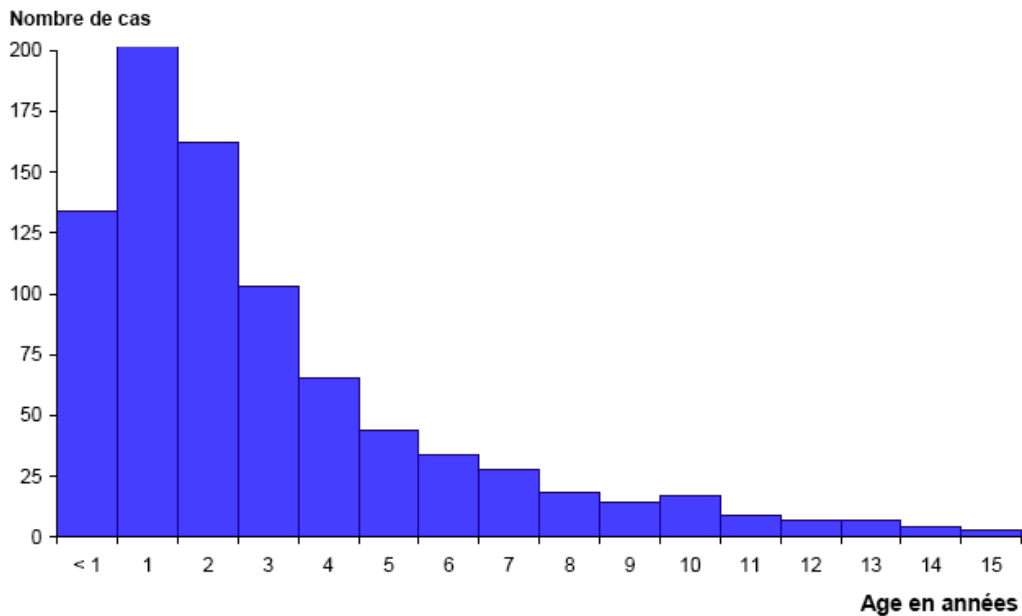


Figure 4 : Distribution par âge du nombre de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans durant la période 1996-2005

1-3. Réservoirs et vecteurs

La diversité des aliments incriminés est importante mais il semblerait que la principale origine soit la contamination par le contenu digestif des bovins. Le rumen et le côlon des bovins semblent en effet constituer le réservoir le plus important des STEC. Cependant ces bactéries ont été retrouvées chez d'autres ruminants tels que les ovins, ainsi que chez les porcins et d'autres animaux sauvages ou domestiques.

Les taux de prévalence sont très élevés et les STEC paraissent ubiquistes dans la population bovine : selon les études et le mode de détection, le pourcentage d'animaux porteurs de STEC varie de 0 à 70% (Pradel *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 1996; Clarke, 1994; Montenegro *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1996). Cette prévalence varie en fonction du mode d'élevage des bovins. En effet, la prévalence des STEC est comprise entre 0,3 et 56% chez les animaux issus d'élevages intensifs, et entre 1 et 45% chez les animaux issus d'élevages extensifs (Hussein, 2007). Cette prévalence est plus faible pour les souches appartenant au sérotype O157:H7 (Hussein and Bollinger, 2005). Plusieurs études ont montré que la prévalence suivait un rythme saisonnier, les mois les plus chauds correspondant à une augmentation du nombre d'animaux porteurs (Jenkins *et al.*, 2002; Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Pradel *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 1994).

Les STEC sont excrétés par les bovins et leur concentration dans les fécès varie d'un animal à l'autre. Une étude réalisée aux Etats-Unis montre que la quantité de bactéries

excrétées varie de 10^2 à 10^5 cfu /g de fécès (Zhao *et al.*, 1995) et plusieurs études laissent supposer que le changement de régime alimentaire serait responsable de l'excrétion intermittente des bactéries (Brown *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 1997; Harmon *et al.*, 1999). Cette excrétion importante des STEC est considérée comme un facteur de risque élevé pour l'exposition et l'infection des humains à ces agents pathogènes (Omisakin *et al.*, 2003; Ogden *et al.*, 2004).

1-4. Sources d'infection

Les STEC entrent le plus souvent dans la chaîne alimentaire par contact des carcasses avec les produits bovins contaminés. Si l'abattage des animaux est correctement réalisé, il est peu probable que les carcasses se trouvent au contact du contenu intestinal des animaux porteurs lors de la découpe. En revanche, il est assez difficile d'éliminer sûrement l'autre source importante de contamination : la peau. En effet, il a été montré que les cuirs des bovins étaient fréquemment porteurs de souches STEC (Elder *et al.*, 2000; Cobbold and Desmarchelier, 2002). Lors de la découpe des carcasses, les bactéries peuvent être ainsi transmises de la peau à la viande par les ouvriers, soit par les mains ayant touché la peau soit par les outils tels que les couteaux (BELL, 1997; McEvoy *et al.*, 2000). Les aliments les plus fréquemment impliqués sont la viande de bœuf (essentiellement les steaks hachés insuffisamment cuits) mais aussi les saucisses, le lait et les produits dérivés (fromages yaourts) (Keene *et al.*, 1997; Vernozy-Rozand, 1997; Hussein and Bollinger, 2005) (tableau 2).

Voie de transmission	Epidémies			Ampleur de l'épidémie		Cas	
	N	Total %	Alimentaire %	Mediane (étendue)	N	Total %	Alimentaire %
Viande bovine	75	21	41	8 (2-732)	1,760	20	33
Vecteur alimentaire inconnu	42	21	23	8 (2-86)	646	8	12
Produit	38	11	21	20 (2-736)	1,794	21	34
Autre produit bovin	11	3	6	17 (2-323)	563	7	11
Autre vecteur alimentaire	10	3	5	15 (2-47)	206	2	4
Produit laitier	7	2	4	8 (2-202)	300	3	6
Sous total, alimentaires	183	52		11 (2-736)	5,269	61	
Voie inconnue	74	21		4 (2-140)	812	9	
Personne à personne	50	14		7 (2-63)	651	8	
Eau récréative	21	6		8 (2-45)	280	3	
Contact animal	11	3		5 (2-111)	319	4	
Eau de boisson	10	3		26 (2-781)	1,265	15	
Laboratoire	1	< 1		2	2	< 1	
Sous total, autres voies	167	48		5 (2-781)	3,329	39	
Total	350				8,598		

Tableau 2 : Nombres d'épidémies et de cas sporadiques d'infection par les O157:H7 en fonction du mode de transmission. Période 1982-2002. (Rangel *et al.*, 2005)

Les fruits et les salades ayant été en contact avec du fumier ont également été mis en cause (Ackers *et al.*, 1998). Deux épidémies survenues en 1991 et 1996 aux Etats-Unis et au Canada ont été attribuées à la consommation de jus de pomme (Besser *et al.*, 1993; Cody *et al.*, 1999). En Suède en 2005 des salades ont été mises en cause lors d'infections dues à O157:H7 (Soderstrom *et al.*, 2005). Entre 1982 et 2002 les fruits et légumes ont été à l'origine de 34% des toxi infections alimentaires dues aux STEC aux Etats-Unis (Rangel *et al.*, 2005). En 2006, aux Etats-Unis des lots d'épinards frais ont été à l'origine d'une épidémie.

Des cas de contamination via l'eau de boisson ou de baignade ont été rapportés (Brewster *et al.*, 1994; Schoonmaker *et al.*, 2000; Mannix *et al.*, 2005). Les contaminations par l'eau représentaient en 2002 9% des épidémies survenues aux Etats-Unis entre 1982 et 2002 (Rangel *et al.*, 2005) (tableau 2). D'autre part, des études menées par Muniesa *et al.* ont mis en évidence des particules virales libres codant les toxines Stx dans les eaux de rivières et en station d'épuration. Ces particules constituent donc un réservoir naturel de gènes *stx* capables d'être acquis par *E. coli* par transduction (Muniesa and Jofre, 1998; Muniesa *et al.*, 1999).

La contamination inter-humaine est également possible et intervient en particulier dans les crèches et les écoles ainsi que parmi le personnel soignant des hôpitaux lors d'épidémies. Entre 1982 et 2002, ce type de contamination qui intervient préférentiellement pendant les mois d'été a été à l'origine de 14% des épidémies dues à O157:H7 et de 8% des cas (Rangel *et al.*, 2005).

1-5. Phylogénie des STEC, classification en séropathotypes

1-5.1. Phylogénie de *E. coli*

En 1984 Ochman et Selander ont constitué une collection de 72 souches *E.coli* d'origine diverse (ECOR). La variabilité génétique au sein de la collection a été analysée et les souches ont été classées en 6 groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2, C, D et E (Ochman and Selander, 1984). Une étude réalisée sur les souches de la collection ECOR et de la collection DEC (comprenant 15 souches responsables de diarrhées) a révélé une dispersion des *E. coli* pathogènes parmi les groupes de la collection ECOR (Boyd and Hartl, 1998). Lors de cette étude, la comparaison des souches portait sur l'analyse des régions spécifiques des îlots de pathogénicité mis en évidence chez les *E. coli* uropathogènes. Il s'est avéré que ces souches ainsi que les autres ExPEC (extra-intestinales) appartiennent majoritairement aux groupes B2 et D. Les auteurs avaient alors suggéré que les îlots de pathogénicité avaient été acquis par les groupes B2 et D puis par transfert horizontal par certaines souches des groupes A, B1 et E. Cependant les souches entéro-pathogènes sont massivement présentes dans les groupes A et B1 en particulier les souches des pathovars EHEC, ETEC (entérotoxigéniques) et EIEC (entéroinvasives). Les pathovars EPEC, EAEC (entéroaggragatives) dont les pathologies associées sont plus modérées sont réparties sur l'ensemble des groupes (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Les souches STEC/EHEC sont présentes dans les groupes phylogénétiques A et B1 mais les souches de sérotype O157:H7 sont regroupées dans le groupe E (Girardeau *et al.*, 2005; Escobar-Paramo *et al.*, 2004).

1-5.2. Origine et phylogénie des EHEC

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC sachant que les relations clonales entre les EPEC et les EHEC sont assez complexes, et que certaines souches appartiennent à des sérotypes communs aux deux pathovars.

Certaines études suggéraient que les EPEC dérivait des STEC ayant perdu les gènes *stx* codant les Shiga toxines. Cependant il est plutôt admis aujourd'hui que c'est l'acquisition des gènes *stx* par deux clones d'EPEC qui a conduit à l'émergence des 2 lignées majeures de EHEC : EHEC-1 constituée de souches O157 et EHEC-2 constituée de souches O26 et O111 (Sperandio *et al.*, 1998; Wieler *et al.*, 1997). En effet, l'analyse des sites d'insertion du Locus d'Effacement des Entérocytes (LEE, voir plus loin paragraphe 2-2.1) et des variants *eae* (codant pour une adhésine, l'intimine) chez les EHEC et les EPEC montre que le LEE aurait

été acquis au niveau de *selC* chez le clone EPEC à l'origine du groupe EHEC-1 (γ -intimine), et au niveau de *pheU* chez le clone à l'origine de EHEC-2 (β -intimine) (Agin and Wolf, 1997).

L'analyse des plasmides des STEC suggère un autre scénario évolutif : l'analyse du gène *ehxA*, codant une entérohémolysine, des 79 souches EHEC représentant 37 sérotypes a mis en évidence deux groupes de souches différents de EHEC-1 et EHEC-2 (Boerlin *et al.*, 1998). Ces résultats sont corroborés par la présence du LEE dans l'un des 2 groupes seulement. De plus, la technique AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) a confirmé que les souches *eae*-positives appartenaient toutes à la même lignée évolutive. Ces résultats suggèrent que c'est d'abord le plasmide qui a été acquis, puis aurait évolué de façon indépendante dans deux lignées. Le locus LEE aurait été acquis à plusieurs occasions chez les souches de l'une des lignées. Cependant certains points de ce scénario évolutif restent obscurs, notamment la raison du transfert du LEE uniquement au sein d'une des lignées.

Karch *et al.* ont quant à eux proposé l'existence de 4 lignées évolutives indépendantes chez les EHEC, caractérisées par le sérotype et les facteurs de virulence : l'une regroupe les souches de sérotype O157:H7, O157:H- et O55:H7 ; une autre les souches O113:H21 et O91:H21 ; une troisième, les souches O103:H2 et O45:H2 ; et enfin les souches O26:H11 et O111:H8 (Karch H., 1999). Ces regroupements ont été aussi établis par Wittham *et al.* et ont été nommés respectivement EHEC 1, STEC 1, STEC 2 et EHEC 2 (<http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/clonal>) (Figure 5).

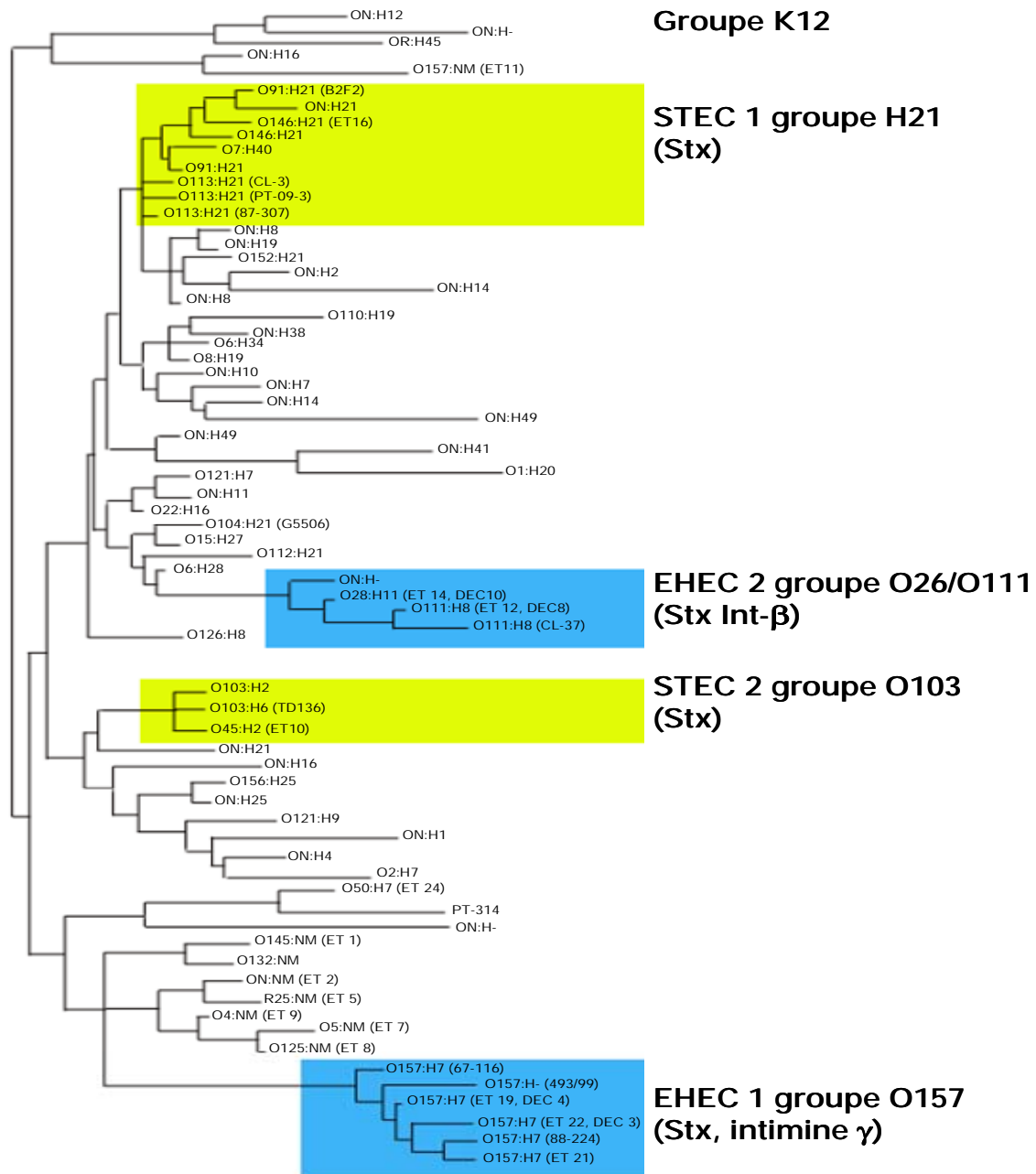


Figure 5 : Diversité clonale des STEC isolés de patients.

Arbre phylogénétique (méthode du plus proche voisin) basé sur les données obtenues par la technique MLEE (sur 20 loci enzymatiques). Les boîtes colorées représentent les 4 groupes de STEC dans lesquels sont présents les clones les plus répandus. ET: type électrophorétique. (Whittam, 1998).

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé en 1998 (Figure 6)

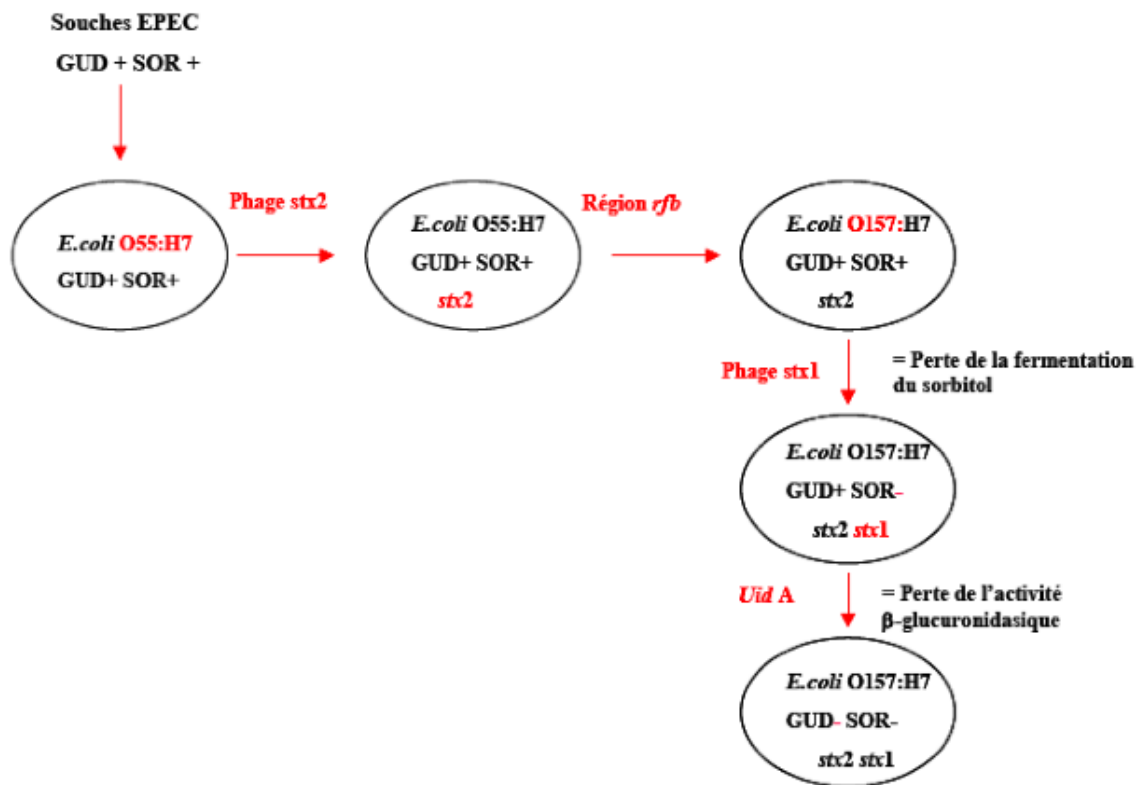


Figure 6 : Modèle de l'émergence de *E. coli* O157.

Modèle basé sur l'analyse MLEE (multi locus enzyme electrophoresis), les mutations des gènes *uidA*, *rfb*, la présence des gènes *stx1* et *stx2*, les phénotypes de fermentation du sorbitol (SOR) et la production de β-glucuronidase (GUD). (Feng *et al.*, 1998)

Les souches génétiquement les plus proches des EHEC O157:H7 seraient des EPEC de sérotype O55:H7. Ces deux lignées auraient émergé à partir d'un ancêtre commun possédant le LEE, il y a au moins trente mille ans (Karch H., 1999; Whittam, 1995). Selon ce modèle, la première étape à l'origine de la séparation des deux lignées aurait été l'acquisition du gène *stx2* vraisemblablement par un mécanisme de transduction par les phages, résultant en l'émergence d'un clone O55:H7 *stx2*-positif. Le clone O157:H7 aurait alors acquis le plasmide pO157, puis aurait perdu la capacité à fermenter le sorbitol puis acquis le gène *stx1* et enfin perdu la capacité à produire une β-glucuronidase (Feng *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2000).

1-5.3. Classification des STEC en sérotypotypes

En 2003, Karmali *et al.* ont proposé une classification des STEC en sérotypotypes basée sur la sévérité des pathologies engendrées et par la fréquence d'apparition d'une pathologie provoquée par les STEC d'un sérotype donné. Cinq sérotypotypes ont ainsi été définis : A, B, C, D et E. Le sérotypotype A est composé des souches de sérotype O157:H7 et O157:NM

qui ont une incidence élevée, qui sont fréquemment à l'origine d'épidémies et qui provoquent les pathologies les plus graves. Vient ensuite le séropathotype B qui regroupe les sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 et O145:NM ayant une incidence modérée, rarement à l'origine d'épidémies, mais provoquant des pathologies graves. La classification va ainsi en incidence et sévérité décroissante (tableau 3), le séropathotype E regroupant donc les sérotypes jamais isolés de cas cliniques (Karmali *et al.*, 2003). Depuis, la distribution des différents facteurs de virulence des EHEC au sein de ces séropathotypes a été étudiée, ce qui a permis l'identification de marqueurs génétiques pour identifier les souches présentant un danger sanitaire (Karmali *et al.*, 2003; Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004). En particulier, Girardeau *et al.* ont montré que certains variants *stx2* étaient préférentiellement associés à un séropathotype particulier (Girardeau *et al.*, 2005).

Séropathotype	Incidence relative	Fréquence d'implication dans des épidémies	Association avec des pathologies sévères	Sérotypes
A	Haute	commune	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	peu commune	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H21, O145:NM
C	Basse	rare	Oui	O104:H21, O91:H21, O113:H21, autres
D	Basse	rare	Non	Multiples
E	uniquement non humaine	NA	NA	Multiples

Tableau 3 : Classification des STEC en séropathotypes en fonction de la fréquence d'isolement lors d'épidémies et de la sévérité de la pathologie engendrée. (Karmali *et al.*, 2003)

2 - PHYSIOPATHOLOGIE

2-1. Résistance à l'acidité gastrique

Après ingestion par le consommateur, les EHEC transitent par l'estomac où ils doivent faire face au premier système de défense de l'hôte, à savoir l'acidité gastrique. Les EHEC possèdent plusieurs mécanismes pour répondre à cette agression, ce qui explique la faible dose infectieuse nécessaire pour provoquer la pathologie. Les 3 systèmes de résistance à l'acidité mis en évidence sont un système oxydatif (AR1), un système arginine dépendant (AR2) et un système glutamate dépendant (AR3) (Choi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2000). De plus, il existe un îlot d'adaptation à l'acidité, appelé « Acid Fitness Island »

(AFI), qui porte des gènes impliqués dans la résistance au stress acide dû à des acides organiques faibles, et à une résistance induite à forte densité cellulaire (Masuda and Church, 2003; Mates *et al.*, 2007). La plupart de ces mécanismes sont inductibles par un stress acide modéré. Ainsi, des conditions préadaptatives dans des milieux à pH faiblement acide permettent une meilleure survie des souches O157:H7 dans des conditions ensuite plus acides (Leyer *et al.*, 1995; Small *et al.*, 1994). Ces mécanismes permettent la survie des bactéries à différentes conditions environnementales de stress acide, telles que les conditions de l'estomac (pH 1 à 3 en présence d'acides minéraux) et de l'intestin (pH 4,5 à 7 en présence d'acides organiques faibles). La résistance aux conditions acides mais également à la chaleur et à la salinité dépendent entre autres du régulateur général de réponse au stress σ^S codé par le gène *rpoS* (Cheville *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2000). Dans ce sens le régime alimentaire des bovins peut avoir un impact sur la résistance des EHEC à l'acidité. En effet, les aliments riches en amidon favorisant le maintien d'un pH légèrement acide et la production d'acides gras à chaînes courtes dans le compartiment ruminal pourraient ainsi permettre aux bactéries d'induire les mécanismes de résistance à l'acidité et par conséquent de survivre dans la caillette, et ainsi permettre à un plus grand nombre de bactéries d'atteindre les sites de colonisation de l'intestin (Boukhors *et al.*, 2002). Une fois induite, la résistance à l'acidité persiste plusieurs jours (Berry and Cutter, 2000). Les bactéries excrétées seraient ainsi plus aptes à survivre dans les aliments fermentés et à traverser le compartiment stomacal de l'homme. L'étude comparative des *E. coli* O157:H7 et des *E. coli* K12 a montré que les O157:H7 étaient plus résistantes à l'acidité (Arnold and Kaspar, 1995; Buchanan and Edelson, 1999; Riordan *et al.*, 2000). En revanche, elles ne paraissent pas plus acido-résistantes que d'autres bactéries commensales (Lin *et al.*, 1996). Des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer si les EHEC, et en particulier les souches O157:H7, présentent un avantage écologique par rapport aux autres *E. coli* dans le tractus digestif du ruminant ou de l'homme.

2-2. Colonisation intestinale: les facteurs d'adhésion

Une fois passé l'estomac, les bactéries se retrouvent dans l'intestin où elles colonisent la muqueuse en adhérant aux cellules épithéliales. Cette colonisation a été observée chez les modèles de porcs gnotobiotiques (Donnenberg *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1995) infectés ainsi que dans les modèles lapins (Pai *et al.*, 1986) et murins (Conlan and Perry, 1998; Wadolkowski *et al.*, 1990), mais à ce jour la colonisation de l'intestin des patients infectés par les EHEC n'a toujours pas été observée. Ceci est probablement dû au fait que les

biopsies faites sur ces individus interviennent à un stade tardif de l'infection quand les bactéries ont déjà été éliminées. L'observation de ces biopsies de patients a néanmoins permis de mettre en évidence des lésions de la muqueuse du côlon et c'est pourquoi il est admis que le côlon est le principal site de colonisation des STEC chez l'Homme (Griffin *et al.*, 1990). L'utilisation d'explants d'intestin humain montre que l'initiation de la colonisation par les EHEC O157:H7 et O103:H2 est limitée aux plaques de Peyer de l'iléon distal (Chong *et al.*, 2007; Fitzhenry *et al.*, 2003). La dissémination des EHEC à partir de ce site initial de colonisation reste à étudier. Les EHEC possèdent plusieurs facteurs d'adhésion participant à cette colonisation.

2-2.1. Le Locus d'Effacement des Entérocytes (LEE)

Les souches de STEC appartenant aux sérotypes A et B possèdent des facteurs de virulence leur permettant d'adhérer de façon intime aux cellules épithéliales. Cette adhésion est à l'origine de lésions dites d'attachement-effacement (A/E) caractérisées par un effacement des microvillosités intestinales subséquent à une réorganisation du réseau d'actine de la cellule épithéliale. Ce réarrangement du cytosquelette provoque l'apparition d'un piédestal sous la bactérie (Frankel *et al.*, 1995; Sherman and Soni, 1988) (figures 7 et 8).

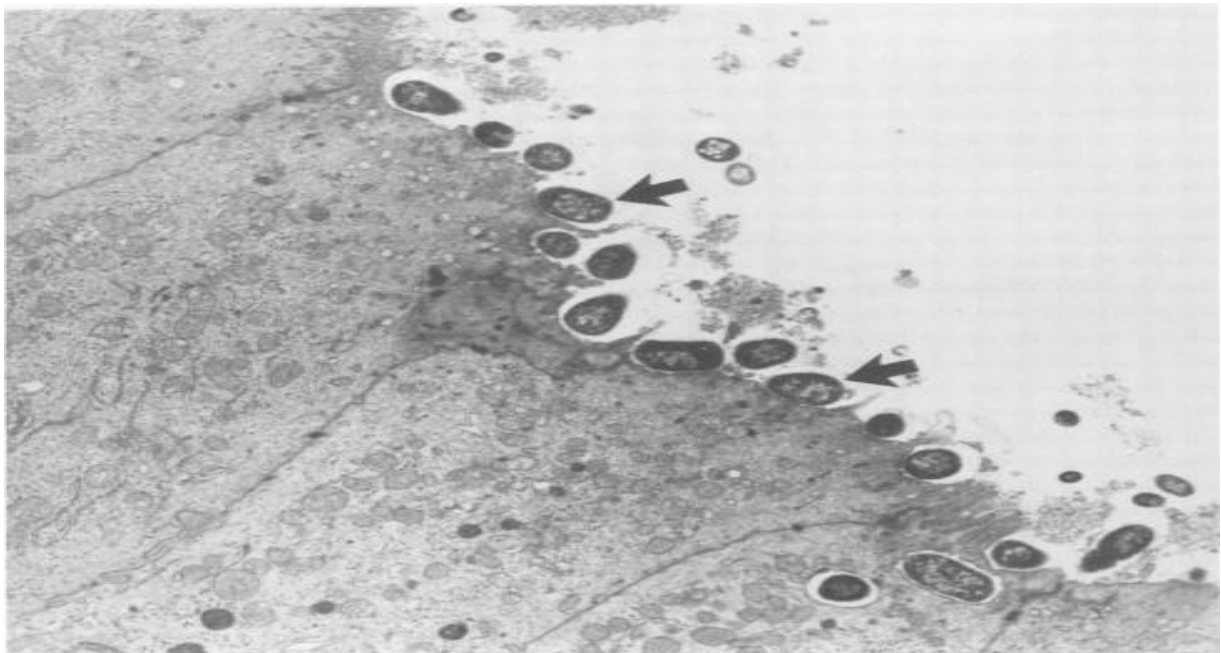


Figure 7 : Phénotype d'adhésion intime.

Observation par microscopie électronique à transmission de lésions A/E provoquées par une souche STEC O113:H- adhérant à la surface des entérocytes d'un iléon distal de lapin (Sherman and Soni, 1988).

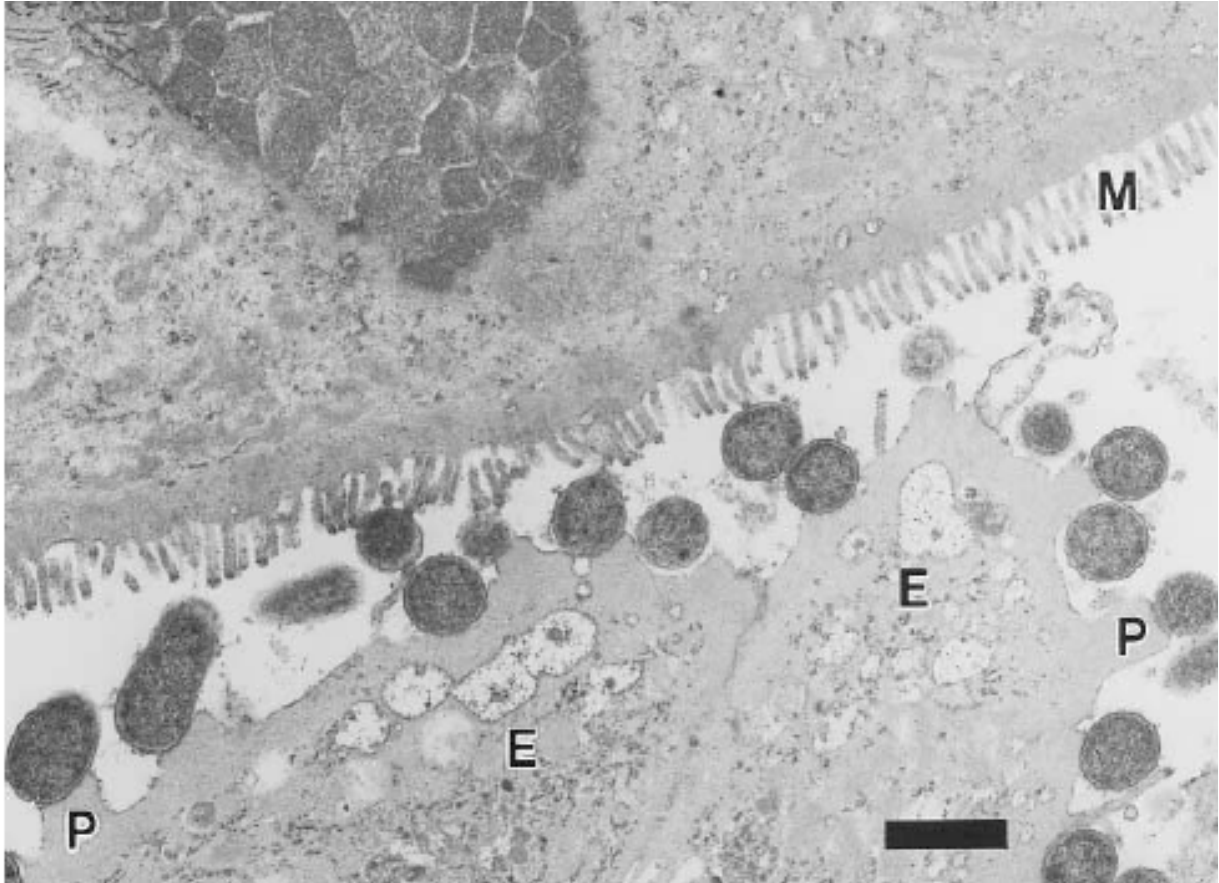


Figure 8 : Lésions d'attachement-effacement induites par une souche *E. coli* O157:H7 sur des cellules rectales de mouton.

Les bactéries adhèrent à la surface des entérocytes (E). Les microvillosités sont effacées et certaines bactéries sont sur un piédestal (P). La bordure en brosse normale est présente (M) sur les entérocytes adjacents non colonisés (Wales *et al.*, 2001).

Tous les gènes nécessaires à la formation de lésions A/E sont localisés sur un îlot de pathogénicité de 43,36 kb appelé LEE pour Locus d'Effacement des Entérocytes, situé sur le chromosome bactérien (Figure 9)

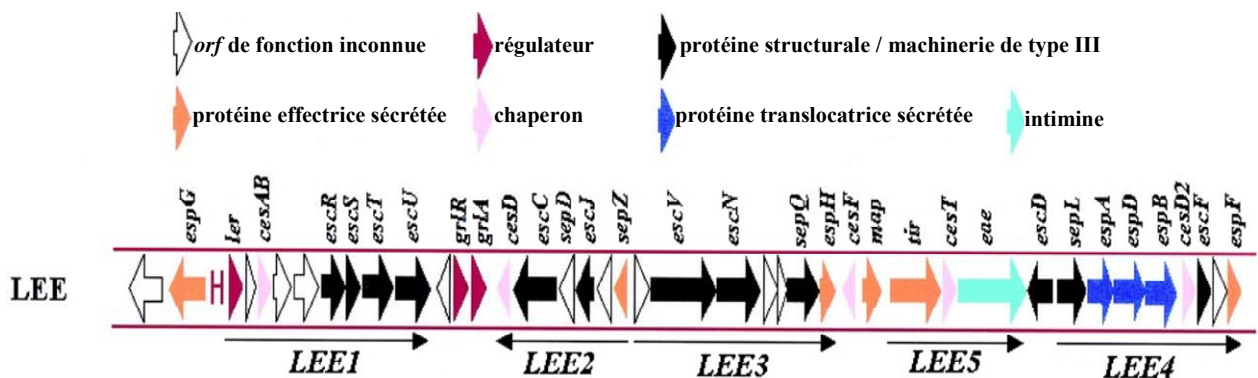


Figure 9 : Organisation génétique du locus d'effacement des entérocytes. Les couleurs des flèches indiquent la fonction des gènes correspondants (Garmendia *et al.*, 2005).

Bien que légèrement différent, ce locus est également présent chez les bactéries *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) qui possèdent aussi cette faculté d'adhésion intime. Le LEE est organisé en 5 opérons majeurs : LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 et LEE4. Il porte un ensemble de gènes (*sep* et *esc*) codant pour un système de sécrétion de type III (SSTT) (Jarvis and Kaper, 1996) (Figure 10).

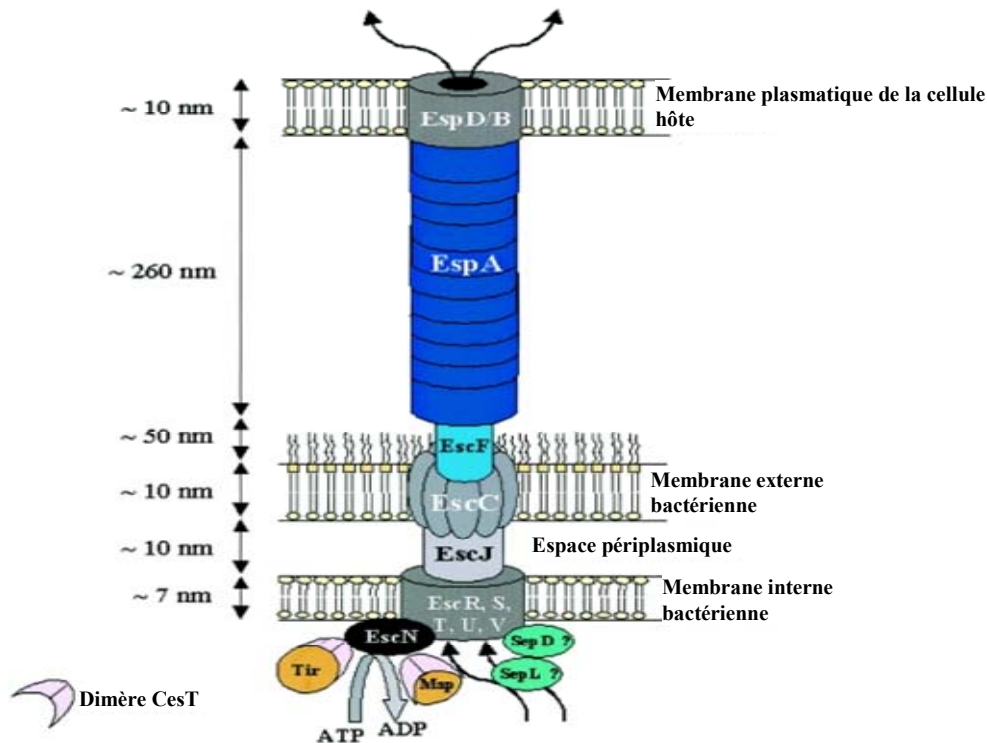


Figure 10 : Schéma du Système de Sécrétion de Type III (SSTT) des EHEC.

La partie basale du SSTT est composée de la secrétine EscC, des protéines de membrane interne EscR, EscC, EscT, EscU et EscV ainsi que de la lipoprotéine EscJ qui connecte les structures en anneaux des membranes internes et externes. EscF constitue la structure de la seringue tandis que les sous-unités EspA polymérisent pour former le filament EspA. EspB et EspD forment le pore de translocation dans la membrane de la cellule hôte connectant ainsi la bactérie avec la cellule eucaryote via le filament EspA. L'ATPase cytoplasmique EscN fournit l'énergie au système en hydrolysant les molécules d'ATP en ADP. SepD et SepL sont des composants cytoplasmiques du SSTT. CesT est une protéine chaperon nécessaire à la sécrétion de Tir en favorisant le contact physique avec EscN (Garmendia *et al.*, 2005).

Ce système de sécrétion est nécessaire pour l'injection à l'intérieur de la cellule eucaryote de protéines effectrices codées par le LEE. Celles-ci perturbent la structure des filaments d'actine, détruisent le réseau de microtubules, de filaments intermédiaires, et participent à la formation du piédestal sous la bactérie adhérente. Elles sont aussi responsables de l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale par destruction des jonctions serrées (Crane *et al.*, 2001), et altèrent la fonction des mitochondries en diminuant leur potentiel de membrane, conduisant à leur mort (Kenny and Jepson, 2000). Le SSTT permet aussi la translocation dans la cellule hôte du récepteur de l'intimine, la protéine Tir (Translocated Intimin Receptor) codée par le LEE (Kenny *et al.*, 1997). De plus, le SSTT est

nécessaire à l'injection dans la cellule hôte de protéines non codées par le LEE impliquées dans le recrutement de l'actine (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004), la colonisation du bovin (Vlisidou *et al.*, 2006), ou dont le rôle est inconnu (Gruenheid *et al.*, 2004). Le LEE porte aussi le gène *eaeA* codant pour l'intimine, facteur de virulence majeur nécessaire à la formation des lésions A/E. L'intimine, qui est insérée dans la membrane externe bactérienne, n'est pas sécrétée par le SSTT mais par la voie générale de sécrétion. L'interaction entre l'intimine et son récepteur Tir établit une adhésion intime aux entérocytes (figure 11) (Donnenberg *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1995).

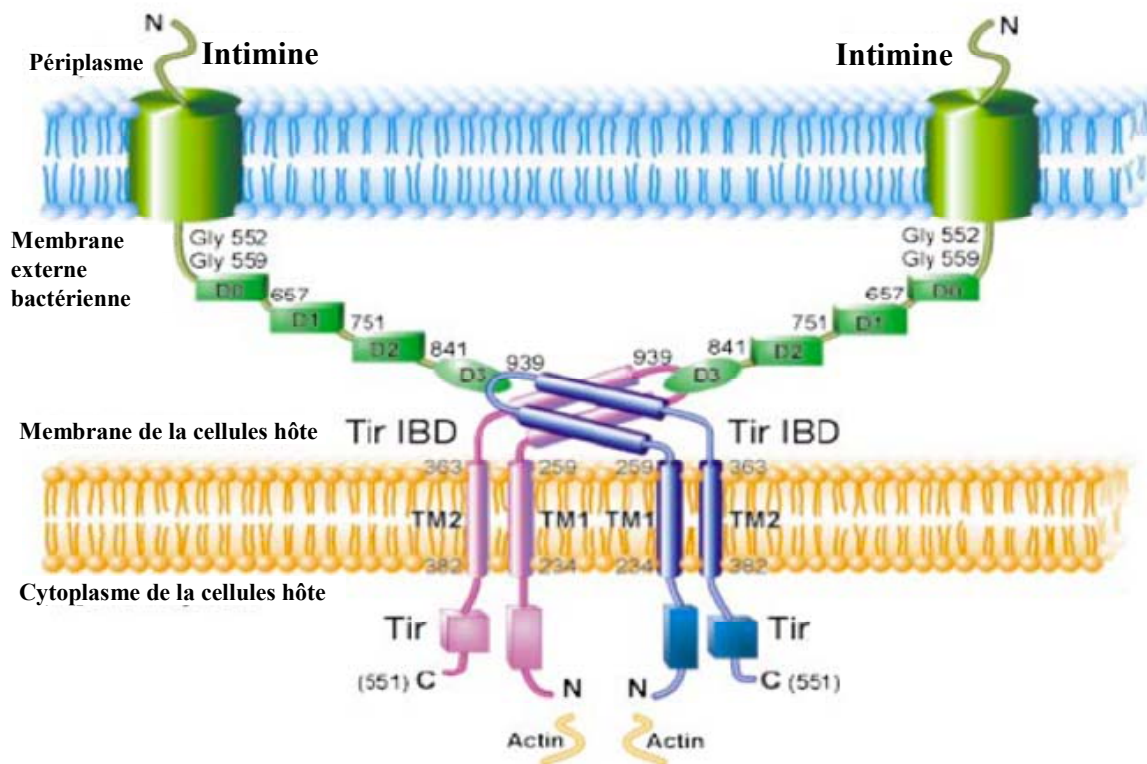


Figure 11 : Liaison intimine-récepteur.

Le modèle est basé sur les données structurales du complexe formé par le fragment C-terminal de l'intimine (domaines D2, D2, et D3) et le intimin-binding domain (IBD) de Tir. L'intimine est montrée en vert avec les domaines identifiés et les résidus extrêmes numérotés. Les domaines Ig-like D0, D1 et D2 sont représentés par des rectangles, et le domaine lectin-like D3, qui se lie à l'IBD de Tir par un ovale. Tir est montré ici en dimère (en rose et bleu foncé) dans la membrane de la cellule hôte et est étiqueté comme l'intimine. L'IBD de Tir est le composant extracellulaire de Tir entouré par les domaines transmembranaires TM prédits. Un IBD dimérique est observé avec 2 hélices dans chaque monomère formant un motif de 4 hélices qui est stabilisé par de multiples liaisons hydrogène et interactions hydrophobes. Le domaine N-terminal de Tir s'ancre via d'autres facteurs (Tccp, N-Wasp, Arp2/3) aux composants du cytosquelette de l'hôte (comme l'actine) qui sont nécessaires à la formation des lésions A/E caractéristiques de la surface de la cellule hôte après adhésion bactérienne (Luo *et al.*, 2000).

L'expression des gènes du LEE est régulée par de nombreux facteurs (figure 12).

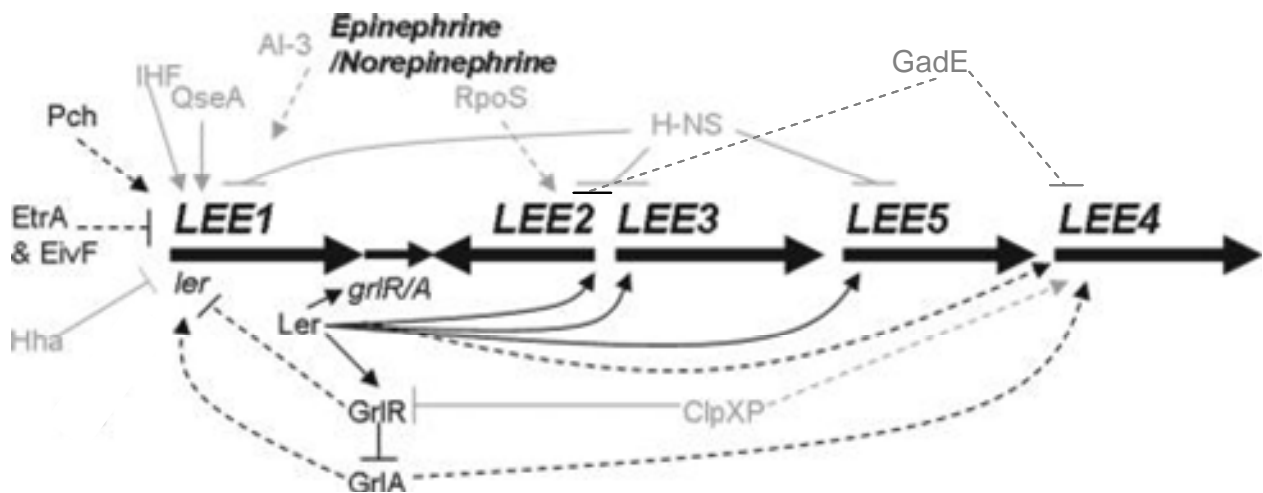


Figure 12 : Figure 12: Modèle de régulation de l'expression du LEE.

Les facteurs montrés en gris sont présents dans les EHEC et *E. coli* K12, tandis que les facteurs représentés en noir sont spécifiques des EHEC. Les lignes pleines représentent les régulateurs dont l'interaction directe avec le promoteur cible a été biochimiquement définie, et les lignes pointillées représentent les interactions indirectes ou qui n'ont pas été biochimiquement caractérisées comme se fixant à la cible. H-NS est un régulateur global qui se fixe aux promoteurs des opérons *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, et *LEE5* et réprime la transcription. Ler active *grlR/A*, *LEE2*, *LEE3*, et *LEE5* en se fixant à leur promoteur déplaçant ainsi H-NS et autorisant la transcription de ces opérons. IHF (Integration host factor) active aussi la transcription de *LEE1*. Hha réprime *LEE1* soit en s'oligodimerisant avec H-NS ou en se fixant directement sur la séquence promotrice. La protéase ClpXP régule l'expression du LEE via des interactions avec RpoS et GrIR. Le signal AI-3 et épinéphrine/norépinéphrine active la transcription de l'opéron *LEE1* et de *ler* via des récepteurs inconnus. GrIR et GrIA, 2 régulateurs codés par le LEE répriment et induisent respectivement la transcription de *LEE1*. EtrA et EivF sont 2 régulateurs codés par un second SSTT non fonctionnel qui régulent négativement l'expression de *LEE1*. Les gènes *pch* sont un autre groupe de régulateurs spécifiques des EHEC qui activent la transcription de *LEE1* et par conséquent le LEE tout entier. Le régulateur GadE réprime l'expression de *LEE2* et *LEE4* indépendamment de Ler (Walters and Sperandio, 2006).

Certains de ces facteurs sont des régulateurs globaux du métabolisme chez *E. coli*, mais d'autres sont retrouvés exclusivement chez les EHEC. Le premier gène du premier opéron du LEE code pour un activateur transcriptionnel, Ler. Ler active la transcription des opérons *LEE2*, *LEE3*, et *LEE5* (Mellies *et al.*, 2007). L'activation de l'expression de *LEE4* est controversée chez les EHEC, mais démontrée chez les EPEC (Sharma and Zuerner, 2004; Elliott *et al.*, 2000). La plupart des autres facteurs régulateurs activent ou répriment l'expression de *ler* (Mellies *et al.*, 2007). Deux autres régulateurs spécifiques de l'expression du LEE sont également codés par le LEE lui-même : GrIR et GrIA, qui sont respectivement un répresseur et un activateur de la transcription de *ler* (Deng *et al.*, 2004). Ler active la transcription de l'opéron *grlRA*, ce qui crée une boucle de régulation nécessaire à une expression optimale du LEE. De plus, deux protéines non codées par le LEE, EtrA et EivF, répriment l'expression de l'opéron *grlRA* (Zhang *et al.*, 2004).

Plusieurs régulateurs globaux contrôlent l'expression du LEE. La protéine H-NS est impliquée dans la thermorégulation du LEE en réprimant la transcription de LEE1 (et donc de *ler*) à 27°C mais pas à 37°C (Umanski *et al.*, 2002). La protéine IHF active l'expression de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999), alors que la protéine HhA la réprime en se fixant directement sur l'ADN ou en se dimérisant avec H-NS (Sharma and Zuerner, 2004). La protéase ClpXP influence l'expression du LEE en interagissant avec RpoS et GrIR (Iyoda and Watanabe, 2005). Le régulateur GadE, qui induit les mécanismes de résistance à l'acidité chez *E. coli*, réprime l'expression du LEE4 indépendamment de Ler (Tatsuno *et al.*, 2003). Il a été montré aussi qu'un petit ARN non codant, DsrA, active la transcription de *ler* en interagissant avec RpoS (Laaberki *et al.*, 2006). Enfin, le quorum sensing active l'expression du LEE, notamment par le régulateur QseA qui active la transcription de *ler* (voir chapitre 5-2.2.1) (Sperandio *et al.*, 2002). Toutes ces données montrent que la régulation de l'expression du LEE est un phénomène éminemment complexe qui n'est pas totalement élucidé, et indiquent que l'expression de ce locus est régulée très finement, certainement en réponse à une grande variété de signaux environnementaux qui ne sont pas encore clairement caractérisés.

2-2.2. Les autres facteurs d'adhésion

D'autres facteurs d'adhésion ont été identifiés chez certaines souches STEC et sont potentiellement impliqués dans l'adhésion à l'épithélium intestinal, en particulier dans le cas de souches ne possédant pas le LEE.

Parmi ces facteurs on peut tout d'abord citer les « long polar fimbriae » ou Lpf. Ce facteur d'adhésion est codé par deux opérons fimbriaux identifiés après séquençage du génome de deux *E. coli* O157:H7, EDL 933 et Sakai (Hayashi *et al.*, 2001;Perna *et al.*, 2001). Ces 2 opérons *lpf* (OI-141 et OI-154) comportent 5 ou 6 gènes dont *lpfA* qui code la sous-unité fimbriale majeure (Torres *et al.*, 2002). Un cluster *lpf* homologue au cluster *lpf* OI-154 de EDL 933 a été identifié dans le génome d'une souche O113:H21 (Doughty *et al.*, 2002), et la présence des gènes *lpfA* a aussi été observée dans le génome de souches STEC de sérogroupes O111, O26 et O70 (Toma *et al.*, 2006). L'introduction de cet opéron dans une *E. coli* K12 dépourvue de fimbriae semble être suffisante pour induire une adhésion aux cellules eucaryotes *in vitro* (Torres *et al.*, 2002). Ces Lpf semblent également jouer un rôle dans la formation de microcolonies par les EHEC et contribuent à la colonisation par les O157:H7 de modèles animaux (Jordan *et al.*, 2004).

Très récemment, il a été montré que les EHEC O157:H7 produisaient des pili de type IV très importants pour la première phase d'adhésion des bactéries à l'épithélium. La production

de ces pili a été démontrée *in vitro* et un mutant déficient pour le gène *hcpA* (hemorrhagic coli pilus) codant pour la protéine majeure de ces pili était fortement déficient pour l'adhésion de la bactérie envers différents modèles cellulaires et d'explants intestinaux. De plus, la mutation de ce gène résulte en l'absence de dommages structuraux infligés par les EHEC aux explants intestinaux de porcs. Enfin, les sera des patients atteints de SHU réagissent à la protéine HcpA, ce qui n'est pas observé pour les patients contrôles. Ceci prouve de façon indirecte que ces pili sont produits *in vivo* lors d'infection par les EHEC (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007).

Iha (Iron-homologue adhesin) est une protéine de membrane qui confère un phénotype d'adhésion diffuse sur lignées cellulaires aux *E coli* O157:H7 et certains STEC *eae*-négatifs de sérotype O113:H21 (Tarr *et al.*, 2000).

Un autre type d'adhésine a été caractérisé par le groupe de Paton dans une souche O113:H21 responsable d'une épidémie de SHU en 1998 : Saa pour STEC Autoagglutinating Adhesine. Le gène *saa* est porté par un plasmide présent chez certaines souches LEE-négatives portant aussi un gène homologue à *iha*. Saa est localisée à la surface de la bactérie et *in vitro* son absence diminue de près de 50% l'adhésion des bactéries aux cellules (Paton *et al.*, 2001).

Efa1 pour EHEC Factor for Adherence a été caractérisé dans une souche de sérotype O111 possédant le gène *eae* (Nicholls *et al.*, 2000). Efa1 est impliqué dans la colonisation de souches STEC O5 et O111 chez le bovin et dans l'adhésion aux cellules épithéliales *in vitro* (Stevens *et al.*, 2002). Le gène *efa1* possède une homologie avec le gène *toxB* présent sur le plasmide pO157, et il a été montré que ToxB et Efa1 interviennent dans l'expression des gènes de l'opéron *LEE4* ainsi que dans la sécrétion des protéines codées par cet opéron (Stevens *et al.*, 2004). Cependant, la mutation de ces 2 gènes (*efa1* et *toxB*) n'altère pas la colonisation des EHEC chez le veau ou le mouton (Stevens *et al.*, 2004). Le gène *efa1* a été retrouvé dans le génome de 99 souches EHEC toutes *eae* positives, mais n'a jamais été retrouvé dans le génome de souches *eae* négatives (Nicholls *et al.*, 2000; Cergole-Novella *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que ce facteur n'est pas une alternative à l'intimine pour l'adhésion des souches STEC LEE-négatives.

2-3. Réponse inflammatoire induite par les EHEC

De nombreuses études cliniques indiquent que la gravité de l'infection aux EHEC, et en particulier l'apparition du SHU chez les enfants, est liée à l'intensité de la réponse pro inflammatoire (Litalien *et al.*, 1999; Westerholt *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2005). Les quantités

de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 mesurées chez les enfants atteints de SHU sont supérieures à celles mesurées chez des enfants contrôles et corrélées à la sévérité de la maladie (Fitzpatrick *et al.*, 1992; Inward *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 1998; Proulx *et al.*, 1998). De plus, une étude rétrospective sur des enfants atteints de SHU a montré que les enfants décédés lors de la phase aiguë de la maladie présentaient les plus fortes concentrations d'IL-8 circulante corrélées à une forte concentration sanguine en neutrophiles (Fitzpatrick *et al.*, 1992). Les cellules de la barrière épithéliale intestinale étant les premières au contact des EHEC, il a été suggéré que la réponse immune mucoale jouerait un rôle prépondérant dans la pathophysiologie de l'infection et le développement du SHU (te Loo *et al.*, 2000; Hurley *et al.*, 2001) : une réaction inflammatoire locale trop importante au niveau de l'épithélium infecté pourrait engendrer une déstabilisation de la barrière intestinale, facilitant ainsi le passage des Shiga toxines par une voie para cellulaire. Ceci aurait pour effet l'activation des immunocytes sous jacents à la muqueuse qui libèrent alors des médiateurs de l'inflammation, augmentant encore la réponse pro inflammatoire, et l'accès d'un grand nombre de molécules de Shiga toxines à leurs récepteurs sur les cellules de l'endothélium vasculaire (O'Loughlin and Robins-Browne, 2001). Les facteurs des EHEC inducteurs de la réponse mucoale sont peu caractérisés. La flagelline de souches LEE-positives et LEE-négatives et de différents sérogroupes (H7, H10, H21) semble être un élément important de l'activation des cellules (Rogers *et al.*, 2003; Berin *et al.*, 2002; Gobert *et al.*, 2007). Un SSTT fonctionnel est également impliqué dans l'induction de la réponse mucoale chez les EHEC LEE-positives O157:H7, mais pas l'adhésion intime médiée par l'intimine (Gobert *et al.*, 2007). La flagelline et les protéines effectrices sécrétées par le SSTT n'agissent pas de concert pour stimuler la réponse inflammatoire, car leur expression est inversement coordonnée par la phase de croissance bactérienne et les facteurs environnementaux (Yona-Nadler *et al.*, 2003). Ainsi, les cellules intestinales peuvent être stimulées par l'un ou l'autre de ces facteurs quel que soit l'état physiologique des EHEC. Les EHEC LEE-négatifs sont également capables de stimuler la réponse inflammatoire des cellules intestinales lorsque la flagelline est peu produite mais le facteur en cause n'est pas caractérisé (Gobert *et al.*, 2007). Cette observation indique que différents groupes clonaux de EHEC ont élaborés diverses manière de stimuler les cellules. S'il est clair que les Shiga toxines stimulent les immunocytes (macrophages, monocytes, neutrophiles polymorphonucléaires) pour la production de cytokines pro inflammatoires, elles diminuent au contraire la réponse inflammatoire des cellules intestinales induite par le SSTT ou la flagelline (Gobert *et al.*, 2007).

2-4. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence ont été recherchés chez les EHEC, et il s'est avéré qu'ils possédaient dans leur génome des gènes codant pour différents types de toxine autre que les toxines Stx. La répartition de ces toxines paraît dépendante du sérotype des souches. Ces toxines ne peuvent cependant pas être absolument définies comme des facteurs de virulence tant qu'on ne connaît pas leur degré d'implication dans la pathogénicité des EHEC en montrant par exemple qu'en ôtant le facteur en question la virulence de la souche est diminuée. Or ce genre de manipulation est assez difficile à réaliser du fait de la multifactorialité de la virulence des EHEC. En effet, le fait de supprimer une toxine secondaire pourrait avoir un effet sur la virulence qui soit peu visible à cause de la présence de tous les autres facteurs de virulence. En outre, l'absence de modèles animaux permettant l'étude de la colonisation et le développement de la maladie liée aux EHEC ne rend pas la tâche facile. Cependant l'étude de la toxicité *in vitro* et *in vivo* de souches non pathogènes dans lesquelles ces facteurs ont été introduits peut permettre de suspecter le caractère virulent de ces facteurs.

2-4.1. L'entérohémolysine

L'entérohémolysine ou E-HlyA présente chez certaines souches STEC est codée par le gène *ehxA* présent sur le grand plasmide pO157 (Schmidt *et al.*, 1996). On la retrouve dans toutes les souches O157:H7 mais aussi dans certaines souches de sérotype O26 ainsi que de sérotypes O113:H21, O91:H21, O103:H2 (données du laboratoire). Elle appartient à la famille des toxines RTX (repeats in toxin). Son mécanisme d'action est probablement comparable à celui de l' α -hémolysine (Pellett and Welch, 1996). Son activité cytolytique est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane et à sa capacité à former des pores engendrant ainsi la lyse osmotique des cellules (Soloaga *et al.*, 1999). Le rôle de E-HlyA a été suspecté à la suite de la mise en évidence d'anticorps anti-E-hlyA chez des patients (Schmidt *et al.*, 1995). Ce mécanisme d'action serait liée à la libération de fer engendrée par les hématies lysées ce qui permettrait un meilleur développement des bactéries. De plus, il existerait un effet synergique de E-hlyA et des Shiga-toxines : E-hlyA induirait la production d'IL-1 β qui active l'expression de Gb3 à la surface des cellules endothéliales (Schmidt *et al.*, 1994). Cette toxine a été identifiée dans le génome de souches isolées de patients atteints de SHU de sérotype O26 ne possédant pas de gène *stx*. La délétion du gène codant pour l'hémolysine réduit considérablement la toxicité de ces souches envers des cellules endothéliales en culture.

Cette hémolysine apparaît donc comme pouvant à elle seule causer des dommages sur le tissu endothélial (Aldick *et al.*, 2007).

2-4.2. La sérine protéase EspP

Un autre facteur de virulence a été décrit en 1997. Il s'agit d'une sérine protéase extracellulaire codée par le gène *espP* situé sur le plasmide pO157 capable de cliver le facteur V de coagulation humain (Brunner *et al.*, 1997). La production de cette sérine protéase résulterait donc en l'aggravation des colites hémorragiques observées chez les patients. EspP a été retrouvé chez certaines souches O26 mais pas chez des souches O103 (Brunner *et al.*, 1997).

2-4.3. La toxine CDT

La toxine CDT (Cytolethal Distending Toxin V) est produite par de nombreuses souches O157:H7 et O157:H-, ainsi que par des souches STEC non-O157 (O91:H21 , O113:H21) (Janka *et al.*, 2003). Il a été montré que la CDT des STEC avait un effet sur une grande variété de lignées de cellules endothéliales ainsi que sur des explants endothéliaux humains. CDT induit de manière dose-dépendante un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M ce qui conduit à la distension cellulaire, l'inhibition de la prolifération, et finalement la mort cellulaire (Bielaszewska *et al.*, 2005). Cet effet avait déjà été démontré pour la CDT de *Campylobacter jejuni* (Whitehouse *et al.*, 1998) et la CDTII de *E. coli* sur des cellules épithéliales (Aragon *et al.*, 1997). Il existerait une corrélation positive entre la présence de la toxine CDT et la capacité des souches STEC non-O157 à provoquer des pathologies sévères (Bielaszewska *et al.*, 2004).

2-4.4. La subtilase

Une nouvelle toxine a été mise en évidence en 2004 par Paton dans une souche O113:H21 responsable d'une épidémie de SHU et a été retrouvée dans d'autres STEC LEE-négatifs appartenant à divers sérotypes (données du laboratoire). Cette toxine appartient à une nouvelle famille de toxine AB5 et possède une activité subtilase (sérine protéase). Elle possède une activité cytotoxique envers les cellules Vero et cause chez la souris des thromboses microvasculaires et des nécroses du cerveau, du foie et du rein (Paton *et al.*, 2004). La subtilase possède 2 activités : une activité d'inhibition de la synthèse protéique par la sous-unité SubA et une activité vacuolisante pour laquelle seule la présence de SubB est nécessaire (Morinaga *et al.*, 2007). Sa production dans une souche *E. coli* K12 rend cette dernière toxique envers toutes les lignées cellulaires testées et envers les souris (Paton *et al.*,

2004), ce qui laisse penser que cette toxine est réellement impliquée dans la virulence des souches qui la possèdent.

3 - LES SHIGA-TOXINES

Les principaux signes cliniques des infections aux EHEC sont dus à la production de Shiga toxines dans la lumière intestinale. Ce sont elles qui sont responsables des symptômes hémorragiques observés chez les patients. Un schéma général du rôle des Shiga toxines dans la physiopathologie de l'infection est présenté figure 13.

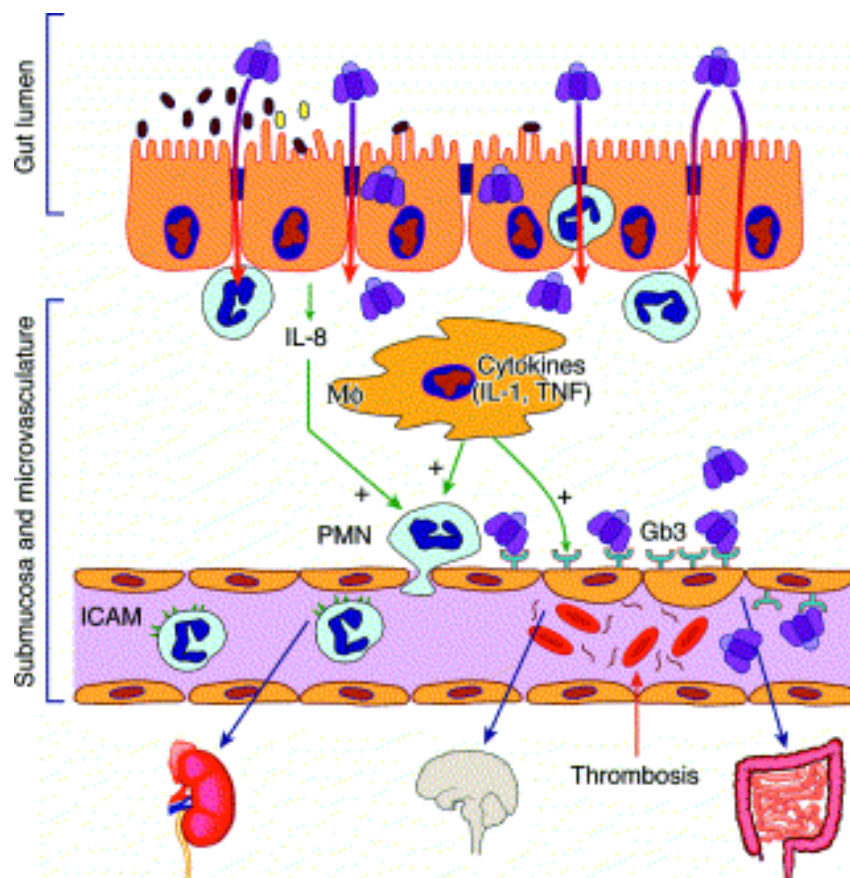


Figure 13 : Physiopathologie des infections à EHEC.

Les Shiga toxines pénètrent dans l'hôte à partir de la lumière du tube digestif à travers les cellules épithéliales, vraisemblablement par la voie paracellulaire. Elles agissent directement sur les cellules immunitaires de la sous-muqueuse, qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires, ce qui augmente l'inflammation et par conséquent la quantité de récepteurs Gb3 à la surface des cellules endothéliales. Les Shiga toxines se fixent sur les récepteurs Gb3 des cellules endothéliales et provoquent une thrombose particulièrement importante dans le cerveau et les reins.

Gb3, globotriaosylceramide; ICAM, intracellular cell adhesion molecule; IL, interleukine; Moφ, macrophage; PMN, leucocyte polymorphonucléaire; TNF, tumour necrosis factor. (O'Loughlin and Robins-Browne, 2001).

3-1. Structure des Shiga toxines

Toutes les souches STEC se caractérisent par la présence dans leur génome des gènes codant les Shiga-toxines (Stx ou SLT ou VT). Ces toxines présentent des homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982;Strockbine *et al.*, 1988). Elles sont codées par deux gènes, *stxA* et *stxB*, qui sont généralement portés par des prophages de type Lambda. Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70-kDa constitués d'une sous-unité A (active) de 33-kDa qui porte l'activité catalytique, et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7-kDa (figure 14) nécessaires à la fixation au récepteur Gb3 (globotriosyl céramide 3) (O'Brien and Holmes, 1987). Les données cristallographiques montrent que les sous-unités B forment un anneau pentamérique qui encercle une hélice α située à l'extrémité C-terminale de la sous-unité A. Cette région C-terminale de la sous-unité A est essentielle pour l'assemblage de l'holotoxine (Haddad and Jackson, 1993).



Figure 14 : Représentation tridimensionnelle de la Shiga-toxine 2.

La sous-unité A portant l'activité enzymatique est représentée en vert tandis que les 5 sous-unités B organisées en anneau sont multicolores. Le pont di-sulfure interne à la sous-unité A est en jaune. Données récoltées dans la banque de données des protéines PDB (PDB ID: 1r4p <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1R4P>) (Fraser *et al.*, 2004)

3-2. Rôle dans la physiopathologie

3-2.1. Action sur l'épithélium intestinal

Les EHEC ne sont pas considérés comme invasifs bien que certaines souches O157 : H7 puissent envahir certaines lignées cellulaires (Oelschlaeger *et al.*, 1994) et que quelques souches LEE-négatives O113:H21 soient capables d'envahir des cellules CHO-K1 (Luck *et al.*, 2005). Les EHEC ne sont en revanche jamais retrouvés dans les organes et les ganglions mésentériques et ne provoquent pas de septicémies. Il n'existe pas de preuve directe de la production de toxine Stx2 *in vivo* chez l'Homme, cependant la toxicité envers les cellules Vero des fécès de patients atteint de SHU a été démontrée (Brigotti *et al.*, 2006). Les toxines Stx sont donc vraisemblablement produites dans la lumière intestinale, il leur est donc nécessaire de traverser la barrière épithéliale afin d'atteindre le tissu endothélial puis la circulation sanguine pour atteindre leurs cellules cibles. Or, les cellules épithéliales intestinales n'expriment pas à leur surface le récepteur spécifique de la toxine Gb3 (Bjork *et al.*, 1987; Holgersson *et al.*, 1991; Schuller *et al.*, 2004). Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer la présence des toxines Stx au contact des cellules endothéliales: elles pourraient passer soit par les brèches créées par la destruction des cellules de la muqueuse, soit par voie paracellulaire après une altération des jonctions serrées, soit par translocation à travers les cellules épithéliales intactes.

Des arguments expérimentaux existent en faveur de chacune des trois hypothèses :

Tout d'abord, il semblerait que les toxines Stx aient un impact sur l'intégrité de l'épithélium intestinal. En effet, en absence de bactéries adhérentes la présence de toxine à forte concentration (1µg/ml) induit des changements structuraux de la muqueuse, en particulier une extrusion des cellules épithéliales. De plus, des observations microscopiques d'ileum de lapins montrent que les Shiga-toxines de *Shigella dysenteriae* à forte concentration altèrent l'épithélium et provoquent une nécrose des cellules épithéliales (Chopra *et al.*, 2006). Cependant, l'effet observé pourrait être attribué non pas à un effet direct de la toxine sur l'épithélium mais à une conséquence sur l'épithélium des dommages causés à l'endothélium (Schuller *et al.*, 2004). En outre, les concentrations de toxines utilisées lors de ces expériences sont assez élevées et on peut mettre en cause la pertinence de l'utilisation de telles concentrations en l'absence de données *in vivo*.

La migration des leukocytes polymorphonucléaires (PMN) de la circulation sanguine vers la lumière intestinale lors de l'infection par des STEC pourrait faciliter le passage des toxines Stx à travers la barrière épithéliale. De nombreux pathogènes intestinaux induisent la

transmigration des PMN à travers des cellules épithéliales intestinales polarisées (McCormick *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1998; Savkovic *et al.*, 1996). Cette transmigration est due à la synthèse d'IL-8. Une quantité importante de leucocytes est plus fréquemment observée dans les fécès des patients infectés par les EHEC que lors d'une infection par *Campylobacter*, *Salmonella* ou *Shigella*, ce qui suggère que cette réponse à l'infection intervient plus fréquemment dans le cas d'une infection par les EHEC que dans celui d'une infection par un autre pathogène intestinal (Slutsker *et al.*, 1997). La quantité de toxine traversant la barrière intestinale est corrélée avec le nombre de PMN traversant la mono couche de cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Hurley *et al.*, 2001). L'hypothèse la plus probable est donc que le passage des PMN augmente la perméabilité paracellulaire de la monocouche, permettant ainsi le passage des toxines Stx vers l'endothélium. Il avait été montré que la toxine Stx1 était capable de se fixer aux PMN pour être ensuite transportée jusqu'aux organes cibles (te Loo *et al.*, 2000), mais cette observation a été récemment controversée (Geelen *et al.*, 2007).

Acheson *et al.* ont montré que la toxine Stx1 était capable de passer à travers un tapis de cellules T84 (n'exprimant pas Gb3) dont la résistance électrique n'avait pas été altérée et que cette translocation était un processus nécessitant un apport énergétique (Acheson and Keusch, 1994). Ce résultat a été confirmé par Philpott *et al.* qui en outre ont mis en évidence la présence de la toxine Stx1 séquestrée à l'intérieur des cellules T84 dans des endosomes associés au transport rétrograde (Philpott *et al.*, 1997). La comparaison des taux de translocation des deux toxines Stx1 et Stx2 a révélé que la toxine Stx2 traverse la barrière épithéliale avec une efficacité plus faible que Stx1. De plus, il apparaît que la translocation de Stx2 est indépendante des microtubules, contrairement à celle de Stx1 (Hurley *et al.*, 1999). En revanche, dans les deux cas une endocytose dépendante d'un récepteur semble être impliquée (Hurley *et al.*, 1999), et il a été montré en microscopie confocale que la toxine Stx1 co-localisait avec la calnexine, protéine chaperon impliquée dans le transport rétrograde (Schuller *et al.*, 2004).

A la lumière de ces résultats, il apparaît difficile de trancher en faveur d'une de ces hypothèses, et ces données mettent à nouveau en exergue la complexité des infections à EHEC. Le mécanisme par lequel les toxines Stx atteignent l'endothélium intestinal est multifactoriel et fait probablement intervenir des éléments des trois mécanismes.

3-2.2. Action sur l'endothélium

Une fois passée la barrière épithéliale et après avoir atteint la circulation sanguine, les Shiga-toxines se fixent sur les cellules qui expriment à leur surface le récepteur Gb3. Chez l'Homme, ce récepteur est exprimé en grande quantité à la surface des cellules glomérulaires rénales et cérébrales, ce qui explique les lésions observées dans ces deux régions chez les personnes infectées.

La première étape du mécanisme d'action est la fixation à la membrane cytoplasmique de la cellule cible (figure 15). Les sous-unités B assemblées en anneau se lient au récepteur Gb3 en reconnaissant le digalactoside terminal (motif Galactose- α (1-4)) (Bast *et al.*, 1999). S'ensuit alors une endocytose puis un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Lors de ce transport rétrograde, la sous unité A subit un clivage protéolytique dans le réticulum endoplasmique (figure 16). Il en résulte la libération de deux fragments, A1 et A2 (Garred *et al.*, 1995). Le fragment A1 possède une activité N-glycosidase qui agit sur l'ARNr 28S de la sous-unité 60S du ribosome, ce qui conduit à l'excision d'une adénine en position 4324 (Endo *et al.*, 1988). Cette dépurination provoque l'inactivation du ribosome et donc l'arrêt de la synthèse protéique

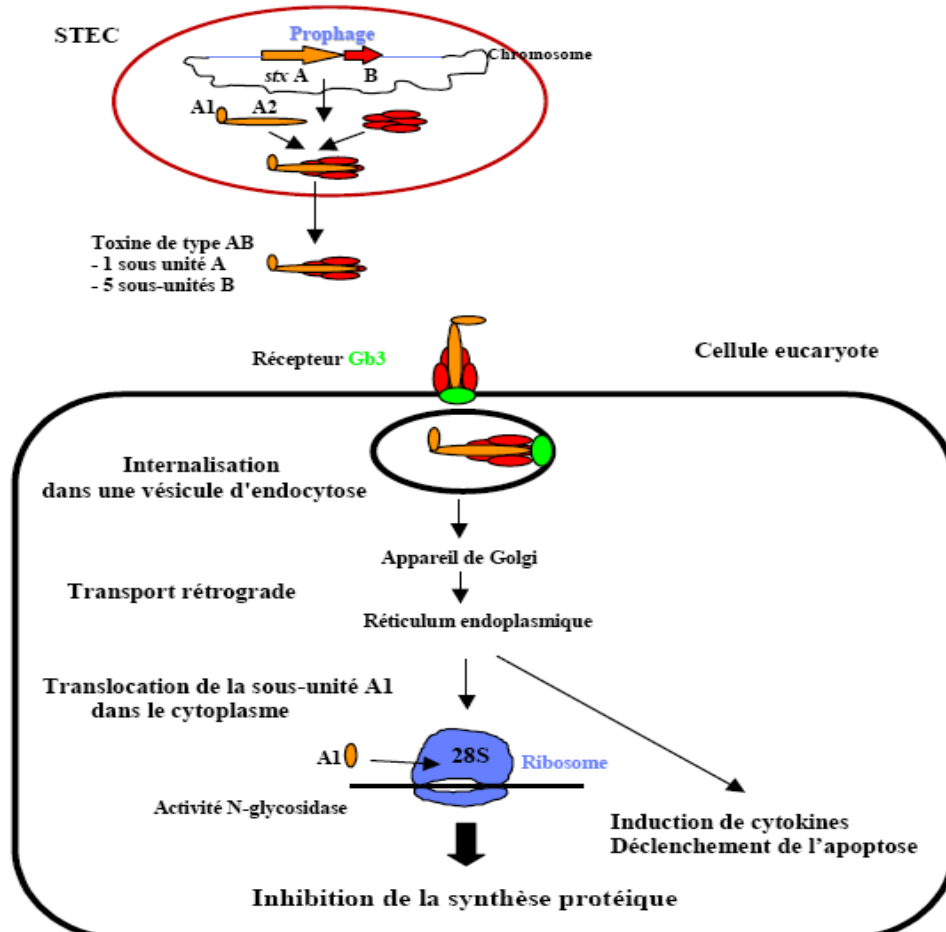


Figure 15 :
Mécanisme d'action des Shiga-toxines.

Les STEC possèdent sur leur chromosome des bactériophages portant les gènes *stxA* et *stxB*. La toxine comporte 1 sous-unité A et 5 sous-unités B. Après fixation de la toxine sur le récepteur Gb3 à la surface des cellules eucaryotes, internalisation, transport rétrograde et translocation, l'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 sur l'ARN 28S entraîne une inhibition totale des synthèses protéiques et donc la mort de la cellule (Pradel N., 2001).

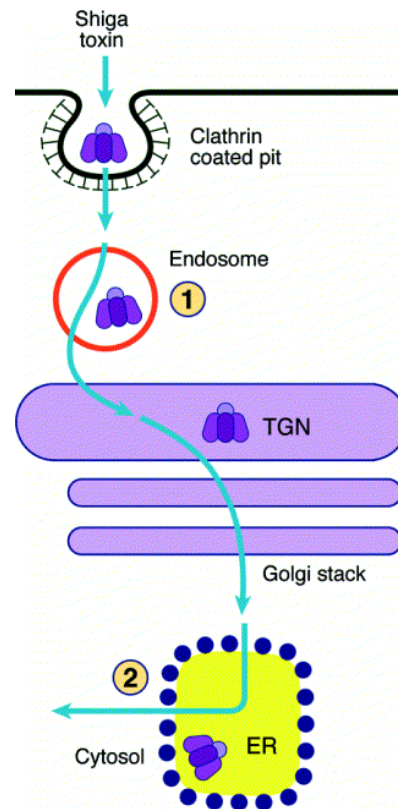


Figure 16 : Internalisation et transport de la Shiga-toxine de la membrane apicale vers le cytosol.

Le clivage catalytique de la sous-unité A intervient d'abord à l'étape 1 par l'intermédiaire de la furine puis par un mécanisme secondaire dans le RE par l'intermédiaire de la calpaïne à l'étape 2. ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans*-Golgi network (Sandvig and van Deurs, 1996).

L'arrêt de la synthèse protéique conduit à l'apoptose des cellules par l'activation en cascade des caspases 8, 3 et 9, menant à la fragmentation de l'ADN (Kodama *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2005; Ching *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2003). Cette activation successive des caspases a été particulièrement étudiée sur les lignées cellulaires Hep-2 (Cherla *et al.*, 2003) et HeLa (Fujii *et al.*, 2003). Une étude parue en 1999 a montré que les Shiga-toxines inhibaient l'apoptose spontanée des PMN, ce qui aurait pour effet d'augmenter la quantité de cytokines proinflammatoires produites et donc d'augmenter les dommages liés à l'inflammation (Liu *et al.*, 1999). Cependant, une étude très récente montre que les Shiga toxines n'ont aucune influence sur l'apoptose des PMN (Flagler *et al.*, 2007). Les différentes techniques utilisées peuvent expliquer cette discordance, et par conséquent il est assez difficile d'affirmer si oui ou non les Shiga-toxines exercent une quelconque action sur les PMN.

3-3. Les différents variants

3-3.1. Description

Il existe deux types de Shiga-toxines : Stx1 et Stx2. Alors que les toxines Stx1 sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae*, les toxines Stx2 ne le sont pas (Strockbine *et al.*, 1986). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99% et 56% d'homologies avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (O'Brien *et al.*, 1982;Strockbine *et al.*, 1988). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques. En effet, un anticorps anti Stx1 n'est pas capable de neutraliser la toxine Stx2. Ceci est expliqué par le fait que les 2 types de toxine ne partagent respectivement que 55% et 57% d'identité en ce qui concerne les sous-unités A et B. En revanche, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires.

3-3.1.1. Stx1

Il existe plusieurs variants Stx dans les deux classes. Le groupe Stx1 apparaît comme le plus homogène. Dans la plupart des cas les gènes *stx₁* de différentes souches présentent la même séquence nucléotidique (Zhang *et al.*, 2002). Paton *et al.* ont comparé les séquences de 3 souches STEC et ont montré que les 3 gènes *stx₁* présentaient 99% d'identité de séquence avec la séquence du phage 933J qui porte *stx₁* dans la souche de référence EDL 933 (Paton *et al.*, 1993;Paton *et al.*, 1995a). Malgré cette grande homogénéité, plusieurs variants *stx1* ont été décrits: *stx₁*, *stx_{1c}*, *stx_{1d}* (Burk *et al.*, 2003;Koch *et al.*, 2001;Beutin *et al.*, 2007).

3-3.1.2. Stx2

La toxine Stx2 est la plus répandue parmi les STEC. Des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires rénales (Louise and Obrig, 1995), et *in vivo* sur des modèles animaux (Lindgren *et al.*, 1993;Wadolowski *et al.*, 1990), indiquent que Stx2 est une toxine plus puissante que Stx1. Ces résultats corroborent les études épidémiologiques indiquant que les souches responsables des cas les plus sévères chez l'Homme, comme les souches de sérotypes de O157:H7, possèdent majoritairement la toxine Stx2 (Boerlin, 1999;Ostroff *et al.*, 1989).

On distingue plusieurs variants pour la toxine Stx2 dont la nomenclature n'est pas très claire, et qui porte souvent à confusion, les auteurs ne donnant pas toujours le même nom au même variant : Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2-vha (Stx2d1), Stx2-vhb (Stx2d2), Stx2-vhc, Stx2e, Stx2f, Stx2-OX3A, Stx2-OX3b, Stx2-O111, Stx2-O48, Stx2-O118, Stx2-NV206 (Ito *et al.*, 1990;Schmitt *et al.*, 1991;Paton *et al.*, 1995;Friedrich *et al.*, 2002;Pierard *et al.*, 1998;Bertin

et al., 2001). Les variants Stx2d1 et Stx2d2 possèdent une caractéristique particulière. Tous deux possèdent un site de clivage par l'élastase présente dans le mucus intestinal. L'élastase clive la sous unité A et rend ainsi les toxines actives (Kokai-Kun *et al.*, 2000; Melton-Celsa *et al.*, 2002). Chaque nouvelle étude ou presque portant sur un nombre important de souches révèle un ou plusieurs nouveau variant. Tous ces variants décrits sur la base de différences de séquence nucléotidique ne varient que très peu en termes de séquence protéique, et par conséquent il est probable que ces différences soient muettes en termes d'activité biologique.

3-3.2. Association des variants Stx avec les manifestations cliniques des infections à EHEC.

Les différents variants Stx ne sont pas isolés avec la même fréquence lors des d'infections par les EHEC. Le variant Stx1 n'est pas présent seul chez les souches de sérotypotype A, le plus virulent. Il est en revanche présent chez les souches appartenant aux autres sérotypotypes, en particulier chez les sérotypes qui ne sont pas retrouvés lors d'infections ou associés aux cas les moins sévères d'infection, qu'il soit seul ou présent sur le génome en compagnie de Stx2 (Girardeau *et al.*, 2005; Boerlin, 1999-; Ostroff *et al.*, 1989). Lors d'études épidémiologiques, il a été montré que ce variant était majoritairement présent chez les souches provenant de patients atteints de simples diarrhées ou même de porteurs asymptomatiques (Boerlin, 1999-; Friedrich *et al.*, 2002). Le variant Stx1c est également très peu associé à des cas de pathologies sévères. En effet, lors de deux études épidémiologiques distinctes, il a été montré que les patients infectés par différentes souches possédant ce variant étaient soit des porteurs asymptomatiques, soit souffraient de simples diarrhées (Zhang *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2003). Aucune information clinique n'est disponible concernant le variant Stx1d, qui semble peu fréquent. Cependant, il est possible qu'il y ait une spécificité géographique. En effet, il est apparu qu'au Brésil la majorité des souches responsables de diarrhées sanglantes, d'anémie hémolytique et de SHU portaient le variant Stx1 (Cergole-Novella *et al.*, 2006). Malgré tout, d'une façon générale, on peut considérer que le type Stx1 est plutôt associé aux souches peu ou pas virulentes.

Les souches portant les variants Stx2, Stx2c et Stx2d (Stx_{2-vha} et Stx_{2-vhb}) activables sont les plus associées aux pathologies les plus sévères comme le SHU, tandis que les variants Stx2e ou Stx2f sont associés à des pathologies telles que les diarrhées ou du portage asymptomatique (Boerlin, 1999-; Bielaszewska *et al.*, 2006; Friedrich *et al.*, 2002; Whittam, 1998) (tableau 4). Ces derniers sont majoritairement retrouvés dans les souches appartenant aux sérotypotypes C, D et E (Girardeau *et al.*, 2005), alors que les variants Stx2 et Stx2c sont

majoritairement portés par les souches de sérotype O157:H7 qui sont les plus virulentes pour l'Homme (Posse *et al.*, 2007). Les STEC produisant Stx2e sont pathogènes pour le porc, provoquant la maladie de l'œdème (Fratamico *et al.*, 2004). Les souches produisant Stx2f sont très rarement isolées de l'Homme, leur réservoir naturel étant le pigeon (Sonntag *et al.*, 2005).

Genotype	SHU (%)	Diarrhées sans SHU (%)	Nb total d'isolats (%)
<i>stx1</i>	23 (4,5)	151 (34,6)	174 (18,3)
<i>stx1c</i>	0	11 (2,5)	11 (1,2)
<i>stx1c + stx2</i>	0	1 (0,2)	1 (0,1)
<i>stx1c + stx2d*</i>	0	22 (5,0)	22 (2,3)
<i>stx1d</i>	0	1 (0,2)	1 (0,1)
<i>stx2</i>	311 (60,9)	120 (27,5)	431 (45,5)
<i>stx1 + stx2</i>	42 (8,2)	12 (2,7)	54 (5,7)
<i>stx2c</i>	16 (3,1)	17 (3,9)	33 (3,5)
<i>stx1 + stx2c</i>	15	15 (3,4)	30 (3,2)
<i>stx2 + stx2c</i>	93 (18,2)	19 (4,3)	112 (11,8)
<i>stx1 + stx2 + stx2c</i>	8 (1,6)	5 (1,1)	13 (1,4)
<i>stx2d*</i>	0	15 (3,4)	15 (1,6)
<i>stx2d activable</i>	3 (0,6)	9 (2,1)	12 (1,3)
<i>stx1 + stx2d*</i>	0	26 (5,9)	26 (2,7)
<i>stx2e</i>	0	12 (2,7)	12 (1,3)
<i>stx2f</i>	0	1 (0,2)	1 (0,1)
TOTAL	0511 (100)	437 (100)	948 (100)

Tableau 4 : Génotype *stx* des STEC et leur fréquence relative parmi les isolats cliniques de patients atteints de SHU et de diarrhées (1996-2004) (Karch *et al.*, 2006).

Les souches STEC possèdent fréquemment plusieurs gènes *stx*. Bien que l'expression de chacun de ces gènes n'ait jamais été montrée dans de telles souches, elles apparaissent plus cytotoxiques pour les cellules Vero que les souches possédant un seul variant (Bertin *et al.*, 2001). Le nombre de gènes *stx* portés par une souche pourrait donc contribuer à sa pathogénicité. Très peu d'études ont été jusqu'à présent conduites pour déterminer si l'association des différents variants Stx avec la gravité de l'infection était corrélée à l'expression des gènes *stx* ou à la cytotoxicité relative de chacun des variants.

3-3.3. Toxicité des variants

Bien que les différences observées sur la séquence protéique des différents variants Stx soient peu nombreuses, elles entraînent toutefois dans certains cas des différences de toxicité des variants Stx envers des modèles cellulaires ou animaux.

Tout d'abord, il apparaît que la toxine Stx1 est beaucoup moins puissante que la toxine Stx2 pour induire la létalité de modèles murins (Tesh *et al.*, 1993). Cette différence a aussi été observée sur modèles cellulaires tels que les cellules Vero.

De plus, des différences de toxicité ont été observées parmi les variants Stx2. Ces observations sont dépendantes des variants qui sont comparés et de l'approche expérimentale utilisée. En effet, dans certains cas une différence de toxicité des variants est observée sur modèle cellulaire mais pas sur modèle animal (Lindgren *et al.*, 1994), et dans d'autres cas les différences sont observées par les 2 méthodes (Paton *et al.*, 1995). On peut donc raisonnablement penser que les différences observées suivant les modèles reflètent effectivement une réalité biologique. Il a ainsi été montré que le variant Stx2-vhb était moins cytotoxique envers les cellules Vero que le variant Stx2. Ce variant Stx2-vhb est activable par le mucus, ce qui pourrait expliquer que la différence de toxicité observée sur modèle cellulaire n'ait pas été confirmée sur modèle animal. Le variant Stx2c est aussi moins cytotoxique que le variant Stx2. L'acide aminé responsable de cette différence de cytotoxicité a été identifié en position 16 de la sous-unité B, nécessaire à la fixation au récepteur Gb3 (Lindgren *et al.*, 1994). Une autre étude portant sur d'autres variants Stx2 a montré que la substitution d'un seul acide aminé dans la sous-unité A pouvait entraîner une baisse de la cytotoxicité du variant Stx2-O111 par rapport au variant Stx2-OX3a. En revanche, c'est plutôt une différence dans la séquence protéique de la sous-unité B qui explique les différences de cytotoxicité observées pour les variants Stx2-O48 et Stx2-OX3b (Paton *et al.*, 1995). Lors de cette étude, les différences observées *in vitro* n'ont pas été toujours retrouvées lors d'expériences *in vivo* dans un modèle murin. Le même groupe a identifié 2 acides aminés dans la sous-unité A qui pourraient être à l'origine d'une toxicité différente des variants Stx2-O48 et Stx2-OX3b envers un modèle murin (Paton *et al.*, 1995b). Il est par conséquent hasardeux d'affirmer qu'il existe des acides aminés particuliers nécessaires à la toxicité des variants Stx *in vivo* ou *in vitro*, celle-ci étant une combinaison d'une bonne capacité de la toxine à se lier à son récepteur (sous-unité B) à laquelle vient s'ajouter sa capacité à inhiber la synthèse protéique (sous-unité A).

3-4. Régulation de l'expression des gènes *stx*.

Afin de bien comprendre la régulation de l'expression des gènes *stx*, il est nécessaire de bien connaître leur organisation. Depuis l'analyse génétique de la souche O26 :H11 H19 et de la souche O157:H7 EDL 933, on sait que les gènes *stx* sont portés par des prophages de type lambda (Scotland *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984)(figure 17). La taille du génome de

différents phages est variable et a été estimée entre 47 kb et 70 kb (Rietra *et al.*, 1989; Willshaw *et al.*, 1987).

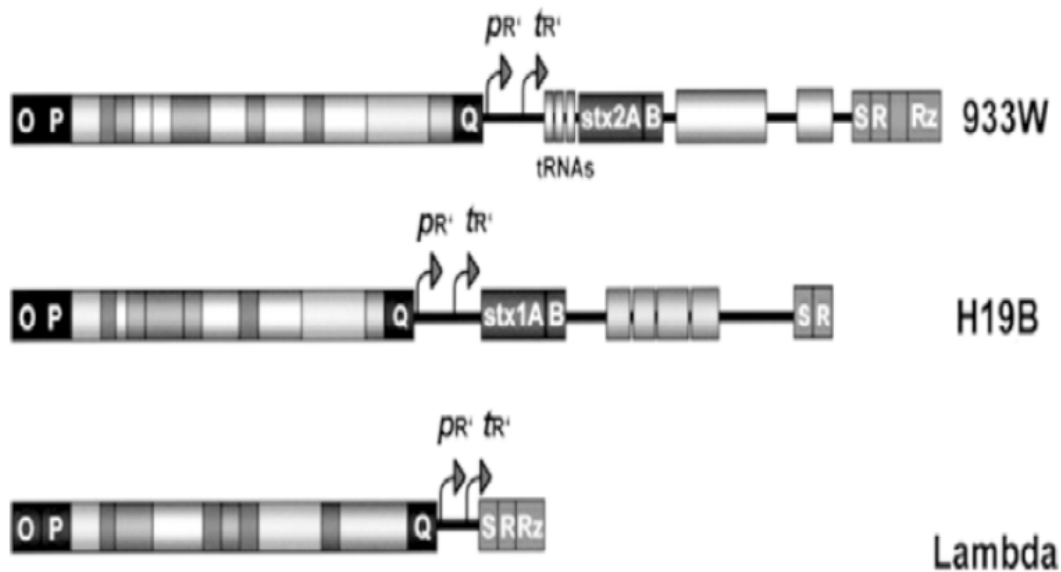


Figure 17 : Représentation schématique des régions précoces et tardives des phages 933W (*stx2*), H19B (*stx1*) et lambda.

Les gènes *O* et *P* représentent les origines de répliation, *Q* code un antiterminateur, *S*, *R* et *Rz* codent les protéines de lyse, nécessaires pour la libération des particules phagiques. Trois ARNt sont localisés en amont du gène *stx2* du phage 933W. Les rectangles entre *O*, *P* et *Q* représentent des gènes dont les phases ouvertes de lecture sont conservées chez les 3 phages (Schmidt, 2001).

3-4.1. La réponse SOS

Les phages portant les gènes *stx* sont inductibles comme les autres phages de type lambda. Cette induction passe par un système bactérien de réponse au stress : le système SOS. Ce système est mis en place dans la cellule bactérienne lorsqu'il y a accumulation d'ADN simple brin dans la cellule suite à des dommages de l'ADN lors d'une irradiation aux UV, lors d'une alkylation de l'ADN, ou lors de tout autre processus d'altération de l'ADN (Sutton *et al.*, 2000). La répliation de l'ADN est alors bloquée, et la réponse SOS se met en place (figure 18). Le régulateur majeur de la réponse SOS est la protéine RecA, présente en faible quantité mais de façon constante dans la cellule. En présence d'ADN simple brin, la protéine RecA se fixe sur l'ADN endommagé pour former des filaments et acquiert ainsi une activité protéase. RecA ainsi activée induit l'autoclivage du répresseur LexA qui réprime les gènes du régulon SOS. Parmi les gènes du régulon SOS figurent les gènes *lexA*, *recA*, les gènes *uvr* impliqués dans la réparation des dommages liés aux UV, le gène *sulA* qui inhibe la division cellulaire afin de laisser le temps nécessaire à la réparation de l'ADN (Janion, 2001). Ces gènes possèdent sur leur promoteur un site de fixation de LexA nommé SOS box. En analysant le génome de *E. coli*, il a été découvert que 1% des gènes possédaient une SOS box

sur leur promoteur (Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2000). La réponse SOS est donc un phénomène cellulaire global dont l'activation est sous la dépendance de nombreux phénomènes physiques ou biologiques qui peuvent aller d'une simple variation de pH à l'action d'antibiotiques ayant un effet sur l'ADN, comme la mitomycine C (MC) ou les quinolones.

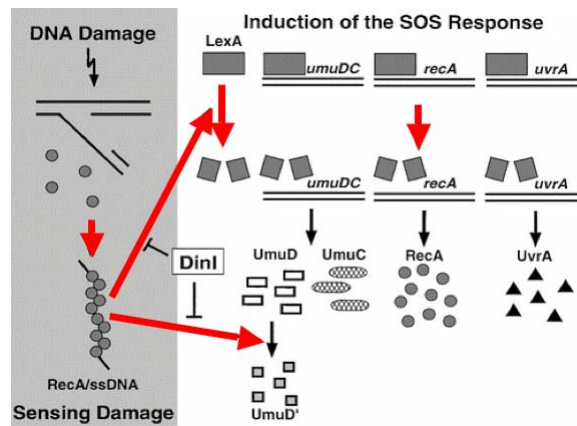


Figure 18 : Induction de la réponse SOS bactérienne.

Suite à une altération de l'ADN, la protéine RecA présente dans le cytosol se fixe à l'ADN simple brin (ssDNA) pour former un complexe nucléoprotéique. RecA acquiert ainsi une activité co-protéase qui permet le clivage du régulateur négatif LexA conduisant à une expression des gènes de réparation de l'ADN, tels *umuC*, *umuD*, *uvrA*. DinI inhibe l'activité co-protéase du complexe RecA-ADN simple brin (Sutton *et al.*, 2000).

RecA induit aussi l'autoclivage du répresseur cI du phage lambda. Le prophage est maintenu en phase lysogénique par le répresseur cI produit par l'expression constitutive des gènes présents sur le phage lui-même (figure 19). Ce répresseur se fixe sur des opérateurs présents sur les promoteurs des gènes précoces du phage, *pL* et *pR*. Les gènes *stx* sont situés en aval d'un autre promoteur tardif du phage, *pR'* (Plunkett *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2001). Un terminateur de transcription assure l'inefficacité de ce promoteur lors de la lysogénie. En revanche, lorsque le phage est induit, le répresseur cI est clivé, l'expression des gènes précoces (de réplication du phage notamment) est rendue possible. Parmi ces gènes précoces se trouve aussi le gène codant pour l'antitermineur Q. Cet antitermineur permet la transcription des gènes tardifs du phage, dont les gènes *stx* et les gènes de lyse, à partir du promoteur *pR'*. En outre les études génomiques ont identifié un autre promoteur, *pstx*, situé directement en amont des gènes *stx* et en aval de l'antitermineur (Sung *et al.*, 1990). Par conséquent, les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *stx* pourraient intervenir au niveau de ces 2 promoteurs par une régulation directe du promoteur *pstx* et par une action sur l'induction de la phase lytique du phage.

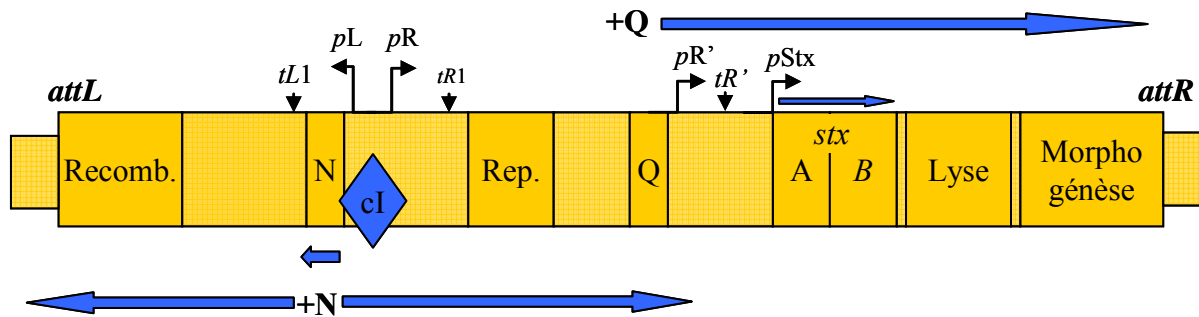


Figure 19 : structure du phage 933W portant les gènes *stx2*.

p: promoteur, *t*: terminateur, *cI*: répresseur, *N*, *Q* : antiterminateurs, *attL* et *attR*: jonctions prophage-ADN bactérien. Les gènes *stx2* sont situés en amont des gènes de la lyse du phage. En phase lysogénique, la réplication du phage est réprimée par *cI*. Les gènes *stx* sont faiblement exprimés sous l'effet d'un promoteur constitutif. Lorsque le phage est induit, le répresseur *cI* subit un autoclivage et les deux protéines *N* et *Q* produites permettent une forte expression des gènes de la réplication, de la lyse et de la morphogénèse du phage ainsi que l'expression des gènes *stx2*.

La Shiga toxine Stx2 est induite par un grand nombre d'antibiotiques dont ceux de la classe des quinolones (Matsushiro *et al.*, 1999; Kimmit *et al.*, 2000). Or les quinolones sont des agents inducteurs puissants du système SOS par l'inhibition d'une ADN gyrase, ce qui provoque une altération de l'ADN et une activation de la protéine RecA (Pidcock *et al.*, 1990). L'absence de RecA dans les bactéries diminue considérablement la production de phages *in vitro*, ce qui se traduit par une totale avirulence de la souche *in vivo* (Fuchs *et al.*, 1999). Une étude parue en 2003 a évalué l'effet d'un traitement à la MC sur des souches STEC provenant de diverses origines (bovines ou humaines responsables de SHU). Au cours de cette étude, il a été mis en évidence que le gène *stx1* était peu induit en présence de MC dans la plupart des souches, tandis que le gène *stx2* était fortement induit dans la quasi totalité des souches (Ritchie *et al.*, 2003). Cette observation a conduit à l'hypothèse que dans la plupart des souches les gènes *stx1* sont situés sur des prophages défectifs.

Cette régulation positive de la production de toxine Stx2 par le système SOS est un phénomène très important puisque cette toxine est à l'origine des cas les plus sévères d'infections par les EHEC. Dans l'intestin humain les EHEC sont probablement soumises à un certain nombre de stimuli qui peuvent avoir un impact sur l'intégrité de leur ADN. Entre autres on peut citer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par les neutrophiles. Il a déjà été montré *in vivo* que H₂O₂ avait une action positive sur la production de Stx2 (Wagner *et al.*, 2001). Les autres stimuli peuvent être dus à la composition même du contenu intestinal humain (pH, présence d'autres bactéries, métabolites, hormones, etc) ou bien aux traitements médicaux administrés aux patients infectés, comme les antibiotiques. Ces antibiotiques pourraient donc avoir un effet positif sur la production de toxine par les EHEC et par

conséquent un effet négatif sur la santé du patient traité en aggravant ses symptômes. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de corrélation claire entre le traitement aux antibiotiques et le développement d'un SHU. Ceci est appuyé par le fait que dans la plupart des cas le traitement antibiotique est administré quand les symptômes hémorragiques apparaissent, ce qui correspond au moment où les EHEC sont déjà éliminées du tractus intestinal, qu'elles ne colonisent que de façon transitoire. De plus, certains stress subis par les EHEC éventuellement présentes dans les aliments lors de la chaîne de préparation pourraient induire une forte production de toxine Stx2. Par exemple, il a été montré que la pression hydrostatique exercée par l'industrie agroalimentaire pour détruire les microorganismes présents dans les aliments pouvait induire une production importante de phages codant pour les toxines par des souches *E. coli* K12 lysogénisées. Cette production de phages est corrélée à une induction de l'expression du gène *recA*. Ces deux observations n'ont cependant pas été retrouvées dans le cas d'EHEC sauvages, laissant supposer que celles-ci disposent de mécanismes de régulation plus fins (Aertsen *et al.*, 2005).

3-4.2. Influence de la concentration en fer

Il était connu depuis de nombreuses années que la synthèse de la Shiga-toxine par *S. dysenteriae* était sous la dépendance de la concentration en fer (Harmsen H. J. M. *et al.*, 1999). En 1982, il a été montré que la production de Shiga toxine de type I chez *E. coli* était aussi réprimée en présence de fer (O'Brien *et al.*, 1982), et que cette régulation était sous le contrôle de la protéine Fur, régulateur transcriptionnel négatif produit en présence de Fe (Calderwood and Mekalanos, 1987), qui se fixe probablement en amont du promoteur *pstx1*. Cependant, la concentration en fer étant faible dans l'intestin, le promoteur *pstx1* est probablement dérprimé et par conséquent il est peu probable que cette répression joue un rôle important *in vivo*. La synthèse de Stx2, quant à elle, n'est pas réprimée en présence de fer (Sung *et al.*, 1990).

Outre les agents endommageant l'ADN, d'autres facteurs peuvent intervenir dans l'activation du système SOS bactérien. En effet, il a été montré que les polyamines, qui sont abondamment présentes dans le tube digestif et aussi produites par *E. coli*, jouaient un rôle dans l'expression du gène *recA* chez *E. coli* K12 (Kim and Oh, 2000; Oh and Kim, 1999). Les polyamines sont impliquées dans l'expression de *recA* en absence d'induction du système SOS mais aussi sous l'effet de la MC et d'autres agents inducteurs. En effet, la déplétion en polyamines diminue de façon drastique l'expression du gène *recA* en conditions basales ou induites. Il apparaît donc que les polyamines sont des médiateurs essentiels à l'expression de

recA et donc à la bonne activation de la réponse SOS chez *E. coli* K12 (Oh and Kim, 1999; Kim and Oh, 2000).

En résumé, comprendre les mécanismes de régulation des gènes *stx in vivo* n'est pas une tâche aisée du fait de la complexité du milieu intestinal et donc de la multitude de stimuli probablement exercés sur les EHEC dans ce milieu aussi bien par l'hôte, les conditions physico-chimiques et le microbiote intestinal.

4 - LE MICROBIOTE COLIQUE HUMAIN.

4-1. Structure du microbiote colique

4-1.1. Biodiversité et composition de la flore colique

La flore colique humaine consiste en une importante biomasse d'environ 10^{14} bactéries réparties en plus de 1000 espèces différentes dont la plupart sont des bactéries à Gram positif et vivent en anaérobiose (Zoetendal *et al.*, 2006).

Depuis les travaux pionniers de Wilson (Wilson and Blichington, 1996), de nombreuses études ont permis de mettre en évidence les espèces bactériennes dominantes issues d'échantillons fécaux d'adultes. Par différentes approches (Dot-Blot, Hybridation Fluorescente In Situ (FISH) et puces à ADN), trois groupes majeurs ont été identifiés (figure 20): le groupe des *Bacteroides* (et les espèces apparentées à ce genre comme *Prevotella* et *Porphyromonas*), le groupe des *Clostridium coccoïdes*, et celui des *Clostridium leptum*. Ces 2 derniers groupes comprennent, en fait, un ensemble d'espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Ruminococcus* et *Clostridium*, ainsi que les espèces *Coprococcus eutactus* et *Faecalibacterium prausnitzii* (Sghir *et al.*, 2000; Wilkinson and Schut, 1998; Franks *et al.*, 1998; Harmsen H. J. M. *et al.*, 1999; Harmsen *et al.*, 2002; Doré J., 2004).

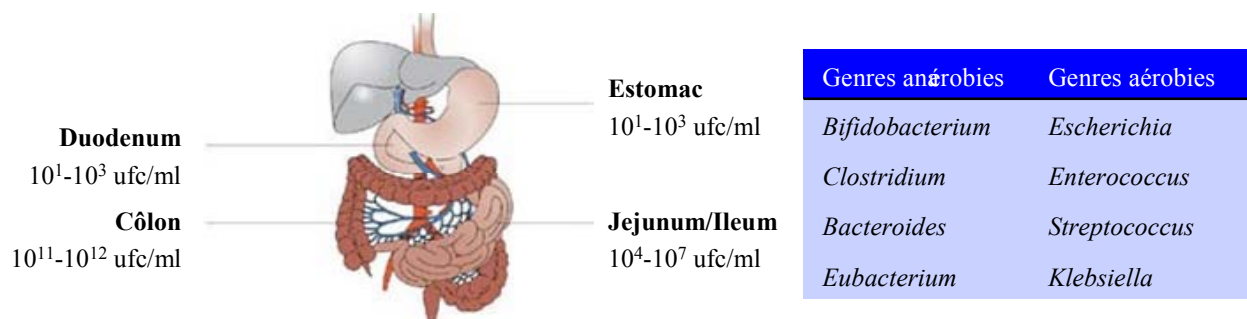


Figure 20 : Densité bactérienne dans le tube digestif humain et principaux genres représentés.

La densité bactérienne augmente en descendant le tube digestif pour atteindre un niveau de population record pour un écosystème. (O'Hara *et al.*, 2006)

Ces études ont aussi montré qu'il existait une grande variabilité inter-individuelle en ce qui concerne la proportion des 3 différents groupes. En effet, les groupes *Bacteroides*, *Clostridium coccoïdes* et *Clostridium leptum* varient respectivement de 7 à 74%, de 6 à 39% et de 7 à 28% de la flore totale (Sghir *et al.*, 2000) (Wilson and Blitchington, 1996) (tableau 5). La technologie des puces à ADN a permis entre autres choses de caractériser très rapidement un écosystème complexe. Ainsi, les espèces *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, et *Ruminococcus productus*, déjà considérées comme dominantes par les autres techniques, ont été retrouvées dominantes dans la flore fécale (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Genres ou groupes bactériens	Franks <i>et al.</i> , 1998 (% de la flore totale)	Sghir <i>et al.</i> , 2000 (% de l'ARN total)	Harmsen <i>et al.</i> , 2002 (% de la flore totale)
	FISH	Dot Blot	FISH
<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>	20	37	27,7
Groupe des <i>Clostridium leptum</i>		16	
Groupe des <i>C. coccoïdes</i>	+ <i>E. rectale</i> 29	14	+ <i>E. rectale</i> 22,7
<i>Ruminococcus</i>	ND	ND	10,3
<i>Lactobacillus</i>	12	2	+ <i>Enterococcus</i> 0,01
<i>Enterococcus</i>	ND	1	+ <i>Lactobacillus</i> 0,01
<i>Atopobium</i>	ND	ND	11,9
<i>Bifidobacterium</i>	3	2	4,8
% total retrouvé	64	70	77,4

Tableau 5 : Comparaison de la composition des principaux genres ou groupes microbiens du côlon par les techniques de Dot-Blot et d'hybridation *in situ* (FISH) (Franks *et al.*, 1998; Sghir *et al.*, 2000; Harmsen *et al.*, 2002).

Des résultats comparables ont été obtenus à partir d'échantillons issus de tissu colique sain. Cependant, la majorité des micro-organismes observés dans ces études (62 à 75 %) ne correspond pas à des espèces connues, indiquant la présence potentielle d'une multitude de bactéries encore non identifiées mais faisant partie de la flore colique dominante (Hold *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2002; Eckburg *et al.*, 2005). La répartition de ces clones à l'intérieur des 3 grands groupes (*Bacteroides*, *Clostridium coccoïdes* et *Clostridium leptum*) est très variable

selon les individus. A l'inverse, 100 % des séquences affiliées au groupe des *Archaea* se rassemblent sur un seul phylotype, celui de *Methanobrevibacter smitii* (Eckburg *et al.*, 2005).

4-1.2. Etablissement et variation de la flore colique

4-1.2.1. Etablissement de la flore colique

Le tube digestif du nouveau-né étant stérile, les premières bactéries colonisatrices du tractus digestif diffèrent selon l'environnement auquel l'enfant est exposé (Edwards and Parrett, 2002). Ainsi, la composition de la flore vaginale et fécale de la mère, et le mode d'accouchement (naturel ou par césarienne) sont autant de facteurs susceptibles d'influencer la diversité bactérienne du tube digestif de l'enfant (Mountzouris *et al.*, 2002). Une flore simplifiée s'implante tout d'abord à partir des flores maternelles vaginales, intestinales et cutanées, puis l'exposition continue aux flores de l'environnement conduit à une flore digestive beaucoup plus diversifiée qui est considérée comme identique à celle de l'adulte vers l'âge de deux ans (Mackie *et al.*, 1999).

Si l'acquisition d'une flore d'adulte peut prendre plusieurs mois, le mode d'allaitement joue également un rôle déterminant dans l'évolution de la composition de la flore entre la naissance et le sevrage. Ainsi, plusieurs études basées sur des approches culturelles ont montré que les enfants nourris au sein développent une flore dominée par les bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* alors que la flore des enfants nourris au lait maternisé est principalement représentée par des *Bacteroides*, des *Clostridium* et des entérobactéries (Fuller R., 1992; Harmsen *et al.*, 2000). Le genre bactérien indicateur de l'alimentation au lait maternisé serait le genre *Clostridium*, dont les espèces sont toujours représentées dans ce cas (Tannock G.W., 1994). D'autres études ont mis en évidence la présence en dominance d'espèces du genre *Ruminococcus* dans la flore fécale d'enfants âgés de quelques jours à plusieurs mois, quel que soit le type d'alimentation (Favier *et al.*, 2002). Cependant, après le sevrage, quel que soit le type d'alimentation antérieure de l'enfant, la composition globale de la flore colique, au niveau des grands groupes microbiens, devient semblable (Mackie *et al.*, 1999).

4-1.2.2. Variation de la flore colique au cours du temps

La majorité des études concernant la stabilité de la flore des sujets adultes indique que celle-ci est stable sur une période de quelques semaines à quelques mois chez le sujet sain, à l'échelle du groupe, du genre, et même de l'espèce (Holdeman *et al.*, 1976; Zoetendal *et al.*, 1998). Franks *et al.* ont étudié la variation de la flore fécale sur 8 mois chez 9 sujets (Franks

et al., 1998). La variation au sein du groupe *Bacteroides* était plus importante que celle du groupe *Clostridium coccoïdes*. Cependant, le genre le plus variable était *Bifidobacterium* chez tous les sujets. A l'opposé, d'autres auteurs ont montré que *Bifidobacterium* était une population stable du côlon sur une période de quatre semaines (Satokari *et al.*, 2001).

Il existe assez peu d'études portant sur la flore du sujet âgé (Blaut *et al.*, 2002; Saunier and Dore, 2002), mais celles-ci montrent que la diversité de la flore augmente avec l'âge. Le vieillissement s'accompagnerait d'une diminution du nombre de bifidobactéries et d'une augmentation concomitante des lactobacilles, clostridies et entérobactéries (Benno *et al.*, 1989; Saunier and Dore, 2002).

4-1.2.3. Variation de la flore en fonction du site colique

Des dénombrements effectués sur des sujets décédés de mort subite indiquent que la composition de la flore fécale est représentative de la population bactérienne présente dans le côlon (MacFarlane and Cummings, 1991). Cependant, le nombre de micro-organismes anaérobies stricts augmente de plus de 100 fois du côlon proximal au côlon distal (Marteau *et al.*, 2001). Les micro-organismes anaérobies facultatifs représentent environ 25 % de la flore dominante de côlon proximal et leur concentration reste constante dans le côlon distal. Les espèces des genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium* sont en nombre significativement plus important dans les selles que dans le côlon proximal (Tableau 6).

4-1.2.4. Variation de la flore colique en fonction de l'alimentation

Une modification importante et constante de la composition de la flore colique d'un sujet adulte semble assez difficile à obtenir par changement du régime alimentaire (Salyers *et al.*, 1985), comme cela a pu être observé chez la souris, le rat et les ruminants. Toutefois, la composition de la flore colique dominante de sujets vivant dans différents pays et ayant, par conséquent, des habitudes et des régimes alimentaires différents (par exemple, sujets occidentaux et orientaux) varie considérablement (Finegold, 1983).

4-2. Fonctions du microbiote humain

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans les fonctions de l'intestin, en exerçant différentes actions protectrices, structurales et métaboliques (figure 21).

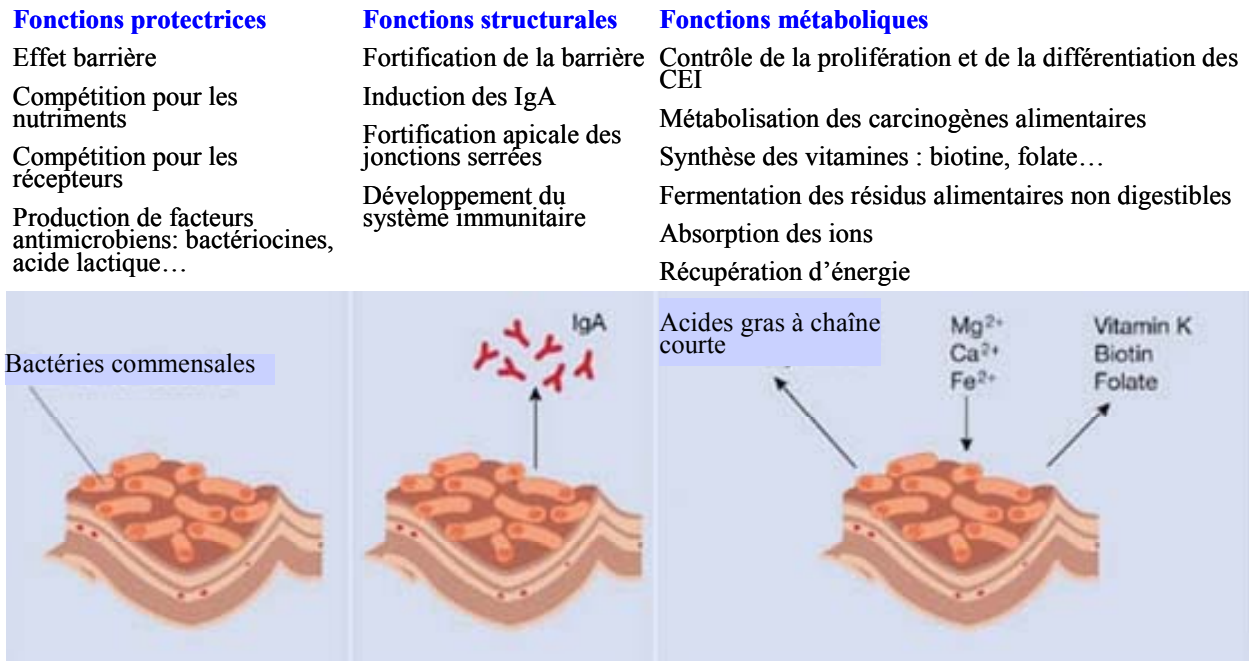


Figure 21 : Différentes actions protectrices, structurales et métaboliques exercées par le microbiote intestinal humain sur la muqueuse intestinale (O'Hara et al., 2006).

4-2.1. Fermentations

La principale fonction des bactéries composant le microbiote intestinal humain est la fermentation de substrats présents dans le tube digestif et apportés par l'alimentation ou l'hôte lui-même. Ces substrats sont multiples : glucides tels que l'amidon résistant, les polysaccharides non digestibles (cellulose, hémicellulose), oligosaccharides (fructo ou glucooligosaccharides, inuline), monosaccharides, mucines et les glucides synthétiques. Les protéines d'origine alimentaire ou endogènes peuvent aussi être utilisées comme substrats au même titre que les cellules épithéliales desquamées ou les acides organiques. Les bactéries sont organisées en chaîne trophique de dégradation, ce qui permet une meilleure utilisation des nutriments et fournit à l'hôte des substrats énergétiques : les acides gras volatils ou acides gras à chaîne courte (AGV ou AGCC). Les acides gras majoritaires produits par le microbiote colique humain sont l'acétate, le butyrate et le propionate. Ces 3 acides gras représentent 85 à 95% des AGCC totaux et le rapport molaire des ces AGCC varie peu ; il est de l'ordre de 60/20/20 (acétate/propionate/butyrate) (MacFarlane and Cummings, 1991). Les autres AGCC, produits en moins grande quantité, sont le lactate, le succinate et le formiate. La production d'AGCC totaux varie de 200 à 500 mmoles/jour (Flourié B., 1988), et la concentration d'AGCC dans le côlon proximal est de 142 mmoles par kg de contenu colique et 96 mmoles par kg dans le côlon distal (Cummings *et al.*, 1987). Cependant, cette production d'AGCC ne représente qu'un apport très mineur d'énergie pour l'hôte, estimée à environ 5% de l'énergie totale ingérée.

4-2.2. Synthèse de vitamines

L'être humain n'est pas capable de synthétiser les vitamines, cofacteurs essentiels pour les fonctions cellulaires et le développement. Une déficience en une ou plusieurs vitamines peut avoir un effet délétère important. Par conséquent, il est nécessaire d'obtenir ces vitamines de manière exogène. Les deux sources de vitamines sont l'alimentation et le microbiote intestinal. En effet, les bactéries sont capables de synthétiser une grande variété de vitamines telles que la biotine (vitamine H), la famille des vitamines B (B1, B2, B5, B6, B7, B9 et B12), la vitamine K. Il a été montré récemment que les voies métaboliques de biosynthèse du folate (vitamine B9), de la thiamine (vitamine B1), de la pyridoxine (vitamine B6) ainsi que de la cobalamine (vitamine B12) sont fortement représentées dans le métagénome du microbiote colique humain (Gill *et al.*, 2006). Les cellules épithéliales humaines sont capables d'absorber ces vitamines grâce à des systèmes de transport efficaces (Said and Mohammed, 2006).

4-2.3. Induction de l'angiogénèse du tube digestif

Le microbiote intestinal est également impliqué dans l'angiogénèse intestinale. Cette vascularisation est aussi médiée par les cellules de Paneth au cours des 4 premières semaines de la vie de la souris. Ces cellules sont capables seules de permettre le développement d'une vascularisation du villus intestinal, mais il a été observé chez les souris axéniques une faible vascularisation comparativement à celle observée chez les souris conventionnelles (Stappenbeck *et al.*, 2002). De la même manière que pour la synthèse d'angiogénine 4, l'inoculation d'un microbiote provoque une vascularisation tardive mais équivalente en termes de densité de réseau à celle des animaux conventionnels. De plus, *B. thetaiotaomicron* est capable à lui seul d'induire cette angiogénèse via les cellules de Paneth (Stappenbeck *et al.*, 2002).

4-2.4. Rôle dans la protection de l'hôte

4-2.4.1. Effet barrière

Un des effets majeurs de la présence d'un microbiote dans le tube digestif humain est la protection de l'hôte contre les infections en empêchant la colonisation du tube digestif par les bactéries pathogènes (Lievin-Le Moal and Servin, 2006). Cet effet barrière s'exerce à plusieurs niveaux, et tout d'abord par une compétition pour les nutriments. En effet, une bactérie exogène ne peut s'implanter que si elle utilise des nutriments différents de ceux utilisés par les bactéries déjà présentes, ou si elle possède un avantage en regard de l'efficacité d'utilisation des nutriments. La flore résidente limite aussi la colonisation par les bactéries

pathogènes en occupant la quasi totalité des sites de colonisation situés sur l'épithélium intestinal. Les bactéries lactiques, qui sont représentées dans le microbiote, ont la particularité d'adhérer même mortes aux cellules intestinales en culture, empêchant ainsi l'adhésion de bactéries pathogènes (Chauviere *et al.*, 1992).

Un autre facteur important pour la mise en place de l'effet barrière est la production d'agents antimicrobiens tels les bactériocines ou l'acide lactique. Les bactériocines sont des composés protéiques produits par les bactéries lactiques, en particulier du genre *Enterococcus* (Nes *et al.*, 2007). Elles sont classées en 4 groupes : la classe I ou lantibiotiques, petits peptides qui subissent d'importantes modifications post traductionnelles. La classe II comprend des petits peptides de 4 à 6 kDa thermostables qui ne subissent pas de modifications post traductionnelles. Cette classe est subdivisée en plusieurs sous-classes. Les bactériocines appartenant à ces 2 classes sont secrétées par un ABC transporteur. La classe III est constituée de grandes protéines thermosensibles, et la classe IV de grandes protéines complexes. Ces bactériocines ou entérocinés possèdent suivant le cas des activités antimicrobiennes contre certaines espèces phylogénétiquement proches de bactéries de la flore, appartenant en particulier aux genres *Enterococcus* ou *Lactobacillus*, mais aussi et surtout contre certaines bactéries pathogènes présentes dans l'alimentation, comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* (Cleveland *et al.*, 2001). Certaines bactériocines peuvent avoir un effet sur des souches pathogènes d'espèces présentes dans le microbiote : par exemple l'entérocin T8 est active contre des souches uropathogènes de *Enterococcus faecalis* de (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006). Les bactéries lactiques produisent en outre de l'acide lactique qui possède un effet délétère sur la survie des agents pathogènes. En effet, la production d'acide lactique a pour effet de baisser très localement le pH intestinal à une valeur qui inhibe la croissance des agents pathogènes.

Outre la production directe de bactériocines, les bactéries de la flore sont capables d'induire la production de molécules antimicrobiennes par les cellules épithéliales (Lievin-Le Moal and Servin, 2006). En effet, l'épithélium secrète des protéines antimicrobiennes, en particulier via les cellules de Paneth situées au fond des cryptes des villosités intestinales. Ces cellules sécrètent des granules contenant de fortes concentrations de molécules antimicrobiennes telles que le lysozyme, la phospholipase A₂ et les défensines ou les angiogénines. La production de ces molécules peut être régulée par la présence de bactéries (figure 22). Par exemple, la production d'angiogénine 4 augmente progressivement chez la souris nouveau-né conventionnelle parallèlement à l'implantation de la flore, et sa concentration atteint

rapidement le niveau retrouvé chez l'adulte (Cash H. L. Hooper L. V., 2005). Cette régulation n'est pas retrouvée chez la souris axénique sauf si on lui inocule *a posteriori* une flore intestinale. De plus, l'espèce *B. thetaiotaomicron* seule est suffisante pour stimuler la production de l'angiogénine 4. Cette régulation par les bactéries n'est pas observée pour la phospholipase A₂ et pour la famille des α -défensines (Hooper *et al.*, 2003).

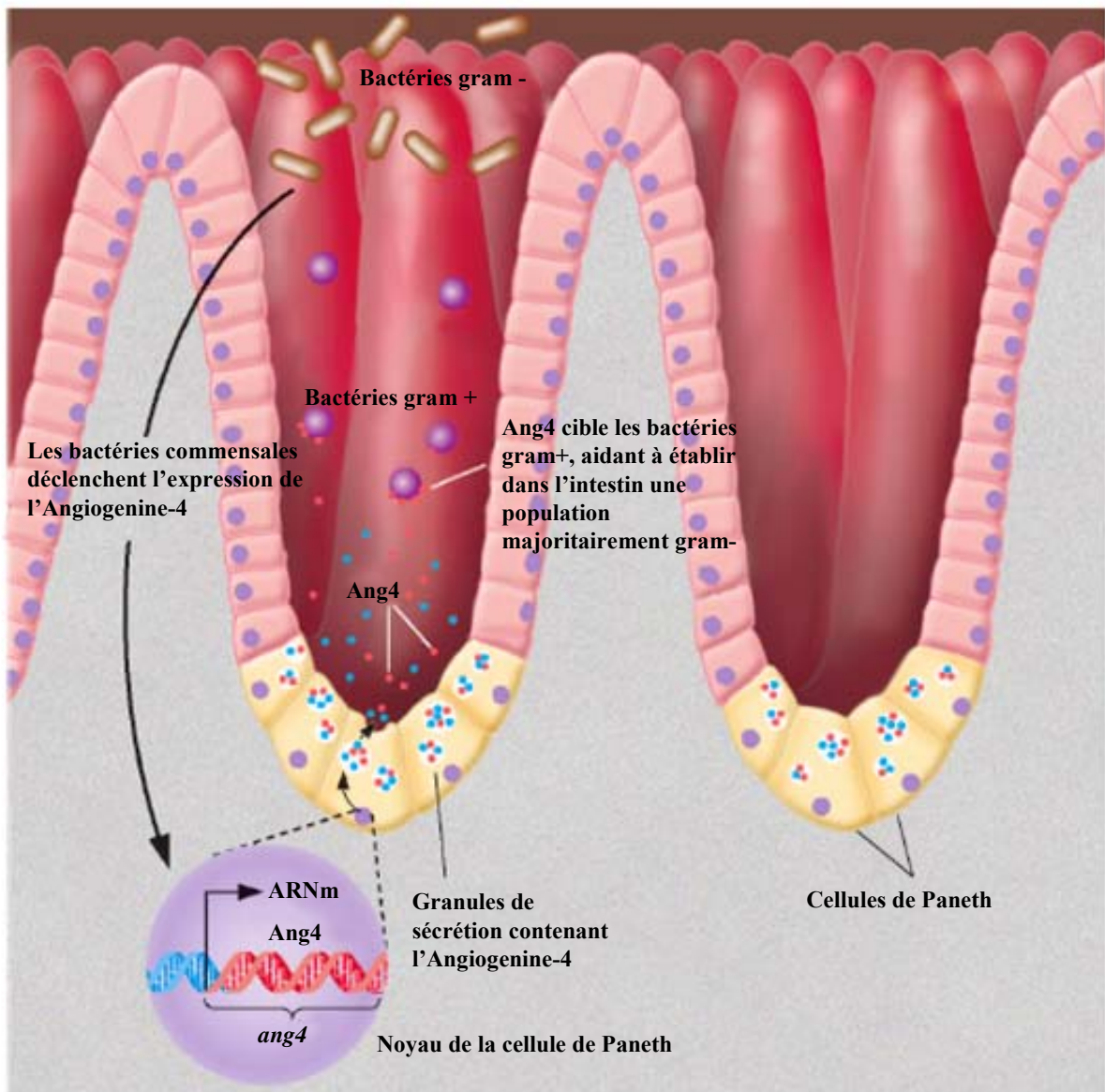


Figure 22 : Contributions bactériennes à l'immunité innée de l'intestin.

Les bactéries commensales déclenchent l'expression de l'angiogénine-4, une protéine bactéricide produite par les cellules de Paneth de l'intestin grêle. Cette angiogénine-4 cible spécifiquement les bactéries à Gram+, tandis que les organismes à Gram- sont épargnés. Les bactéries jouent un rôle central dans la formation de l'arsenal antimicrobien des cellules de Paneth. Les molécules signal utilisées par les bactéries pour communiquer avec les cellules de Paneth sont inconnues (Cash H. L. Hooper L. V., 2005).

4-2.4.2. Développement de l'immunité

Une autre fonction du microbiote colique est le développement du système immunitaire. En effet, de nombreuses études montrent que le microbiote intestinal est nécessaire à la maturation du tissu lymphoïde intestinal et au bon développement du répertoire des lymphocytes B. Les lymphocytes se développent au contact d'antigènes intestinaux auxquels ils sont confrontés, notamment au niveau des plaques de Peyer (Mowat, 2003). Or, il a été observé que les animaux axéniques possèdent peu de plaques de Peyer, et que le cas échéant celles-ci sont moins actives que chez les animaux conventionnels. L'inoculation d'une seule espèce bactérienne ne suffit pas à rétablir un développement complet des plaques de Peyer. Ceci suggère donc qu'un large consortium bactérien et donc d'antigènes est nécessaire à un bon développement des lymphocytes B. Le microbiote contribue aussi au développement des lymphocytes intraépithéliaux qui sont insérés entre les cellules épithéliales intestinales (Umesaki *et al.*, 1993).

4-2.4.3. Homéostasie de la réponse inflammatoire.

Les cellules épithéliales sont constamment exposées aux microorganismes commensaux. De façon assez surprenante, la quantité de bactéries présentes ne provoque pas une inflammation de la muqueuse intestinale en conditions physiologiques. Il semble donc que la réponse immunitaire innée soit sévèrement régulée pour éviter une inflammation chronique. L'ensemble des mécanismes de régulation impliqués n'a pas encore été identifié, mais le rôle de certaines voies de signalisation a été démontré. En effet, la voie de régulation des Toll Like Récepteurs (TLR) sous l'effet des bactéries commensales apparaît essentielle pour le maintien de la fonction barrière (Cario *et al.*, 2004;Vora *et al.*, 2004)(figure 23).

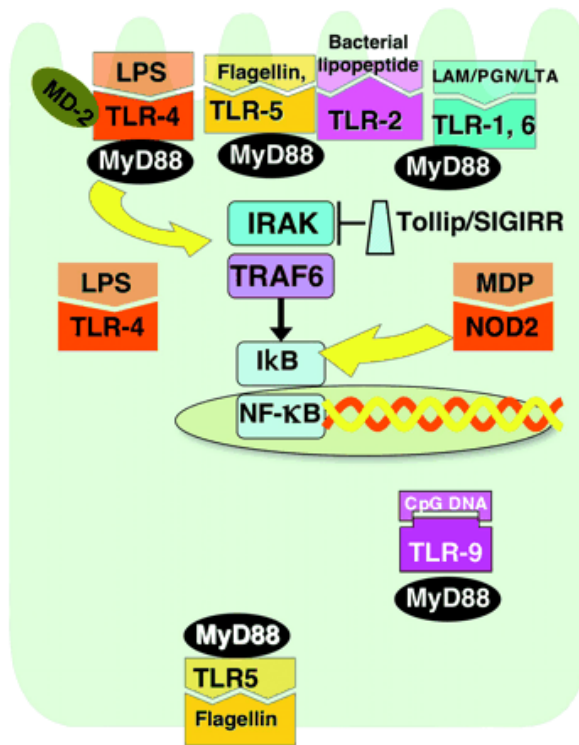


Figure 23 : Les voies de signalisation des TLR dans les cellules épithéliales intestinales (CEI).

L'expression de TLR4 et MD-2 est faible dans les CEI en particulier dans le côlon. TLR4 permet la reconnaissance du LPS aussi de façon intracellulaire. MD-2 est une protéine accessoire nécessaire à la reconnaissance du LPS par TLR4. MyD88 est une protéine adaptatrice nécessaire à l'activation des voies de signalisation induites par la fixation des ligands bactériens au TLR. TLR5 reconnaît la flagelline, TLR2 reconnaît le lipopeptide bactérien et TLR1-TLR6 reconnaît le peptidoglycane, le lipoarabinomannane et l'acide lipoteichoïque. TLR5 est exprimé aux pôles basolatéral et apical. NOD2 et TLR9 sont intracellulaires. La voie de signalisation des TLR utilise plusieurs intermédiaires utilisés par les récepteurs à l'interleukine-1 dont la protéine IRAK. IRAK via la protéine TRAF6 permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB en phosphorylant IκB. IRAK est inhibé par Tollip ou SIGIRR. Le récepteur cytoplasmique NOD2, une fois activé par le muramyl dipeptide (MDP: la plus petite unité du peptidoglycane commune aux bactéries Gram + et Gram -) agit directement sur IκB (Abreu *et al.*, 2005).

Ces récepteurs cellulaires sont présents à la surface des cellules épithéliales intestinales et reconnaissent certains ligands bactériens comme le LipoPolySaccharide (LPS) (TLR4), l'acide lipoteichoïque (LTA) (TLR2), la flagelline (TLR5), le PeptidoGlycane (PGN) (TLR2). Plusieurs études ont montré que l'activation des TLR via l'adaptateur MyD88 eucaryote par le microbiote intestinal jouait un rôle essentiel dans l'inhibition de l'inflammation chronique du côlon (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Pour expliquer la tolérance de l'épithélium aux bactéries commensales, 2 mécanismes peuvent être envisagés. La première hypothèse serait une sous-expression constitutive de ces TLR. En effet, les cellules épithéliales intestinales expriment peu de TLR2 et TLR4 et par conséquent ne montrent pas une forte réponse à la présence de LPS et de peptidoglycane (Abreu *et al.*, 2001; Melmed *et al.*, 2003). L'induction d'une tolérance des cellules épithéliales après une exposition répétée aux ligands est un autre mécanisme envisagé. En effet, l'exposition aux ligands d'origine bactérienne provoque une réduction de la quantité de récepteurs TLR à la surface de la cellule, bien que la quantité de protéine TLR totale dans la cellule reste identique. De plus, une protéine Tollip (Toll-interacting protein) inhibitrice des voies de signalisation des TLRs via la protéine IL-1R-associated Kinase (IRAK), est surexprimée dans les cellules exposées au LPS et LTA (Otte *et al.*, 2004). La protéine cytoplasmique Nod2 pourrait aussi être impliquée. Cette protéine reconnaît un composant du PGN bactérien et il a été montré que la

mutation de *nod2* induit la voie de signalisation des TLR. Nod2 répondant au peptidoglycane aurait donc une action régulatrice sur la signalisation des TLR conduisant à l'activation de NF- κ B et donc à une inflammation (Watanabe *et al.*, 2004). En absence d'induction les 2 sous-unités de NF- κ B sont piégées dans le cytosol par l'inhibiteur I κ B. Lors de l'activation des TLR, I κ B va être ubiquitinylé, ce qui provoque sa destruction par le protéasome, libérant ainsi NF- κ B qui va être transloqué dans le noyau. Or les bactéries commensales peuvent inhiber l'inhibition de I κ B et ainsi empêcher la translocation de NF- κ B est avoir un rôle anti inflammatoire (Neish *et al.*, 2000).

Les bactéries commensales peuvent donc moduler la réponse inflammatoire afin de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal en conditions non physiopathologiques. Les microorganismes commensaux sont en outre capables d'atténuer la réponse inflammatoire induite par les bactéries pathogènes afin d'éviter une altération trop importante de la barrière épithéliale (figure 24). En effet, *Bacteroides thetaiotaomicron* est capable d'inhiber la production d'IL-8 induite par *E. coli* O157:H7 ainsi que le recrutement des leucocytes par *Salmonella* Enteritidis.

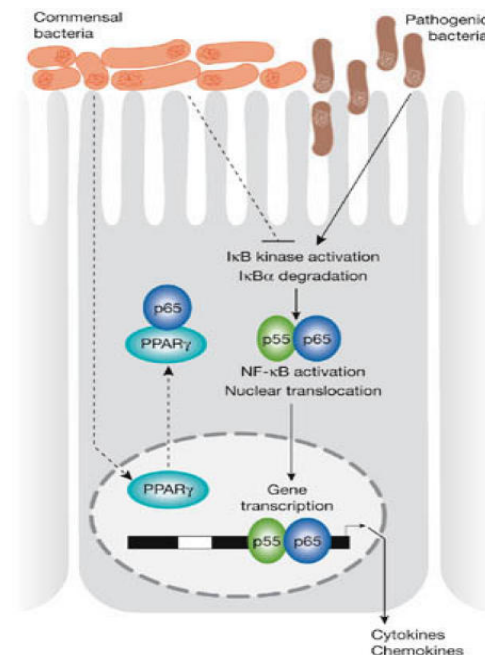


Figure 24 : Mécanismes d'inhibition de l'activation de NF- κ B.

Les bactéries pathogènes déclenchent l'activation de la kinase I κ B, la dégradation de I κ B α et la translocation nucléaire des sous-unités p50/p65 de NF- κ B. Certaines bactéries commensales court-circuitent ces effets en favorisant l'exportation hors du noyau de p65 via des associations avec le peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ). D'autres bactéries commensales inhibent la dégradation de I κ B α (O'Hara *et al.*, 2006).

En fait, *B. thetaiotaomicron* favorise l'export de RelA (sous-unité de NF- κ B) en association avec le facteur anti inflammatoire PPAR γ hors du noyau, ce qui diminue l'effet de ce facteur transcriptionnel (Kelly *et al.*, 2004) (figure 25). *Lactobacillus reuteri* inhibe quant à lui l'inflammation induite par *Salmonella enterica* en empêchant la dégradation de I κ B (Ma *et al.*, 2004), tandis que *Bifidobacterium infantis* et *Lactobacillus salivarius* inhibent la production d'IL-8 NF- κ B dépendante induite par *Salmonella* Typhimurium (O'Hara *et al.*, 2006).

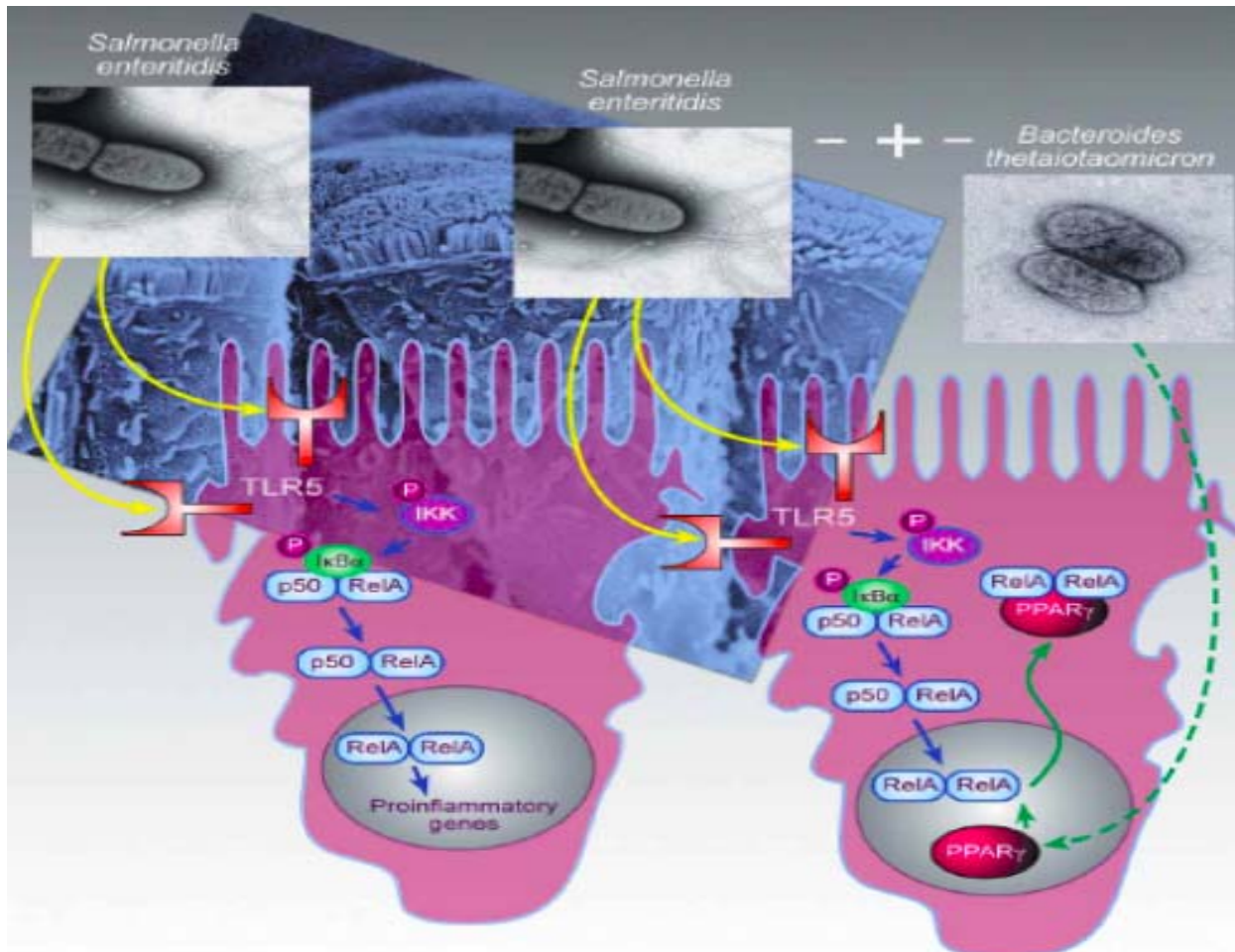


Figure 25 : Action anti-inflammatoire de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Après contact avec les CEI, *Salmonella* Enteritidis déclenche l'activation de la kinase I κ B, la dégradation de I κ B α et la translocation nucléaire de la sous-unité RelA de NF- κ B. La flagelline de *Salmonella* via l'activation de TLR5 est cruciale pour l'activation de l'expression de gènes proinflammatoires NF- κ B dépendante. *B. thetaiotaomicron* exerce ses effets antiinflammatoires en favorisant l'exportation de RelA. Cet effet est dépendant du récepteur nucléaire PPAR γ qui s'associe physiquement à RelA et l'exporte hors du noyau terminant ainsi le processus proinflammatoire (Kelly *et al.*, 2005).

4-3. Influence des bactéries commensales et probiotiques lors d'infections à EHEC

A l'heure actuelle aucune étude n'a été menée pour analyser l'effet du microbiote intestinal humain sur la croissance des STEC ou sur l'expression de leurs facteurs de virulence. Les seules études disponibles jusqu'à présent concernent l'effet d'autres *E. coli* sur la persistance des EHEC et/ou la production de toxine. La plupart des études récentes s'intéressent plutôt à l'effet d'un probiotique donné sur la colonisation des EHEC O157:H7 et sur la production de certains facteurs de virulence chez la souris.

4-3.1. Effet des *E. coli* commensaux

Les bactéries commensales peuvent avoir un effet sur la colonisation des *E. coli* O157:H7. En effet, la présence de souches *E. coli* commensales chez la souris traitée à la streptomycine diminue de façon significative les taux d'excrétion fécale d'une souche *E. coli* O157:H7 (Gamage *et al.*, 2006). Mais la présence des bactéries commensales peut également favoriser l'infection par les EHEC. En effet, il a été montré que des souches *E. coli* commensales non pathogènes peuvent être transduites dans l'intestin de souris par les phages des EHEC codant les gènes *stx*, ce qui augmente les quantités de phages *stx* et de Shiga toxines produites *in vivo* (Acheson *et al.*, 1998; Gamage *et al.*, 2003; Gamage *et al.*, 2006). Cependant ces études ont été réalisées dans un modèle de souris traitées à la streptomycine. Dans ce modèle les *E. coli* commensaux ont été éliminés et les seuls *E. coli* présents sont les souches de laboratoire susceptibles ou non aux phages apportées par l'expérimentateur. Ces études ne tiennent donc pas compte de la susceptibilité aux phages *stx* des *E. coli* commensaux. Or, la majorité des *E. coli* présents dans l'intestin sont résistants à une infection par un phage (Kasman, 2005), et la proportion d'*E. coli* sensibles aux phages a été estimée à 10% de la population totale des *E. coli* commensaux (Gamage *et al.*, 2004b). L'impact que pourrait avoir cette sensibilité aux phages de certaines souches *E. coli* en conditions réelles *in vivo* lors de l'infection par les EHEC est encore hypothétique.

En outre, il a été montré que le LPS de 2 souches *E. coli* non pathogènes de séro groupe O107 et O117 avait la capacité de se fixer à Stx2 et de diminuer sa toxicité envers les cellules Vero, ce qui tend à prouver que certains composés connus ou inconnus produits par les bactéries commensales peuvent avoir une influence sur la toxicité de la toxine Stx2 (Gamage *et al.*, 2004a).

Toutes ces observations indiquent que les *E. coli* commensaux peuvent influencer la persistance des EHEC et par conséquent la production de toxine dans le tube digestif. Les caractéristiques de ces *E. coli* (sensibilité aux phages par exemple) semblent être importantes pour la propagation des phages codant les toxines et pour l'éventuelle neutralisation des toxines produites. En revanche, aucune étude ne montre l'effet du microbiote intestinal global sur les EHEC, en particulier sur l'expression de leurs facteurs de virulence.

4-3.2. Effet des probiotiques lors d'infections par les EHEC

Les probiotiques sont des microorganismes (bactéries ou levures) qui, ingérés vivants en quantités suffisantes, sont capables d'exercer des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte. Les principales bactéries utilisées comme probiotiques sont majoritairement des bactéries lactiques. L'essentiel des probiotiques disponibles sur le marché appartient donc aux genres *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* et *L. acidophilus*) et *Bifidobacterium* (*B. animalis* et *B. lactis*).

Les études pionnières du groupe de Reid ont démontré que les lactobacilles possédaient des propriétés anti-adhésives qui leur permettaient d'inhiber l'adhésion de bactéries pathogènes aux cellules hôtes (Reid *et al.*, 1995). Il avait donc été suggéré que les lactobacilles et les bifidobactéries partageaient ce mécanisme pour combattre les pathogènes gastrointestinaux. En effet, les bactéries pathogènes sont étroitement associées à la muqueuse intestinale grâce à des facteurs d'adhésion produits par la bactérie. Si une telle association ne se fait pas, l'agent pathogène est rapidement éliminé. Un certain nombre d'espèces de lactobacilles et de bifidobactéries ont été montrées responsables d'une baisse de l'adhésion sur modèles cellulaires d'agents pathogènes des genres *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Listeria* ou *Escherichia*. (Atassi *et al.*, 2006; Bernet *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2003; Osset *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Johnson-Henry *et al.*, 2007).

En plus de l'inhibition compétitive de l'adhésion à la muqueuse intestinale qu'ils exercent sur les microbes pathogènes, les probiotiques sont capables de produire des agents antimicrobiens ou bien de stimuler l'immunité mucoale. En effet, il a été montré que les bactéries du genre *Lactobacillus* produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui a pour effet d'inhiber la croissance de *Gardnerella vaginalis* lors de vaginose (Mastromarino *et al.*, 2002). Un tel effet n'a pour lors pas été démontré dans le tube digestif mais certaines souches intestinales du genre *Lactobacillus* sont également capables de produire du H₂O₂ (Annuk *et al.*, 2003). Les lactobacilles produisent en outre des acides tels que l'acide lactique et l'acide acétique et par conséquent peuvent baisser le pH de manière très locale et inhiber ainsi la

croissance d'agents pathogènes comme *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, etc.... Les probiotiques modulent la réponse immune de l'hôte en activant la production de cytokines pro et anti-inflammatoires, ce qui permet le recrutement des cellules du système immunitaire sur le site de l'infection (Servin, 2004).

Enfin, les probiotiques sont capables au même titre que les bactéries commensales de produire des bactériocines actives contre certaines espèces des genres *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* entre autres (Silva *et al.*, 1987). La baisse du pH provoquée par la production d'acide lactique permettrait d'augmenter l'effet des bactériocines en perméabilisant les membranes (Alakomi *et al.*, 2000).

Les probiotiques semblent donc posséder un réel potentiel bénéfique pour l'hôte lors d'une infection intestinale en agissant à plusieurs niveaux de l'infection : la colonisation, la réponse immunitaire, et la réponse antibactérienne. Plusieurs études montrent un effet des probiotiques sur les EHEC aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans des modèles murins d'infection.

4-3.2.1. Impact des probiotiques sur la colonisation des EHEC et la production de Shiga-toxine

Plusieurs études ont montré l'impact des probiotiques sur la colonisation intestinale dans des modèles animaux d'infection par les EHEC. En 2001 Ogawa *et al.* ont montré que la souche Shirota de *Lactobacillus casei* permettait l'élimination d'une souche *E. coli* O157:H7 du côlon de lapereaux coinfectés avec ces deux souches. La souche probiotique quant à elle subsistait dans cet organe et la souche *E. coli* O157 était capable de se maintenir à un niveau de population élevé en absence du probiotique (Ogawa *et al.*, 2001a). Il a été observé aussi que le pH du côlon n'était pas significativement différent chez les lapins traités par la souche probiotique comparé à celui des lapins non traités. La concentration d'acide lactique était légèrement augmentée dans le cas des lapins traités par le probiotique. La quantité de toxine dosée dans les 2 lots de lapins était différente. En effet, les côlons de lapins inoculés avec la souche probiotique contenaient moins de toxine que ceux des lapins contrôles. De plus, les IgA anti Stx étaient en concentration plus importante dans les premiers (Ogawa *et al.*, 2001a). Des résultats similaires ont aussi été obtenus *in vitro* dans des cocultures de STEC et *Lactobacillus*. Dans ce cas, l'inhibition de la croissance des STEC a été reliée à la production d'acide lactique par la souche probiotique (Ogawa *et al.*, 2001b). L'inhibition de la colonisation par les EHEC des souris traitées par les probiotiques peut aussi être expliquée par le fait que les probiotiques diminuent l'expression de certains facteurs de virulence qui sont impliqués dans cette colonisation. Cette idée est corroborée par une étude *in vitro* récente

montrant que l'expression des gènes du LEE est diminuée dans un milieu de culture conditionné par la souche probiotique *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Medellin-Pena *et al.*, 2007). Dans un modèle de souris traitées à la streptomycine, le probiotique *Bifidobacterium breve* Yakult inhibait la production de Stx2 induite par la MC sans inhiber la croissance de la souche EHEC. Cette inhibition était due à la baisse de pH et à l'augmentation de la concentration d'acétate induite par le probiotique, mais le mécanisme précis n'a pas été caractérisé (Asahara *et al.*, 2004).

4-3.2.2. Impact des probiotiques sur la réponse immunitaire lors d'infections à EHEC.

Une étude publiée en 2002 montre que le traitement d'un lot de souris par une souche de *Lactobacillus rhamnosus* provoquait une augmentation de la quantité d'anticorps circulant anti-O157 chez ces souris comparativement au lot de souris non traitées. Ceci est accompagné d'une forte quantité de leukocytes chez les souris traitées (Shu and Gill, 2002). Ces observations vont dans le sens de précédentes études qui ont montré que les probiotiques ont la capacité d'augmenter les taux d'anticorps anti Stx (Ogawa *et al.*, 2001a).

5 - LE QUORUM SENSING.

Le quorum sensing est un système de signalisation intercellulaire par lequel une bactérie appréhende la densité de population des bactéries de son environnement, et le cas échéant régule en réponse l'expression de certains gènes. Il a été montré que le microbiote intestinal produit des molécules signalisatrices de quorum sensing (Sperandio *et al.*, 2003). Il pourrait ainsi influencer sur l'expression des gènes de virulence des micro-organismes pathogènes. Les molécules signalisatrices du quorum sensing produites par les bactéries sont appelées autoinducteurs. Quand la concentration d'autoinducteur atteint un seuil critique dans le milieu extérieur, les bactéries répondent au signal en modulant l'expression de certains gènes. Le quorum sensing a originellement été décrit il y a 30 ans lors de l'étude de la régulation de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970) et depuis s'est révélé répandu dans l'ensemble du règne bactérien en tant que système de régulation génique. La nature des molécules signalisatrices est très diverse et inclut aussi bien des peptides, essentiellement chez les bactéries à Gram+ (Kim and Kaiser, 1990; Kleerebezem *et al.*, 1997), des acides gras (Downard and Toal, 1995), que des acyl homosérine lactones (AHL, HSL ou AI-1), l'indole, des furanones (Eberhard *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Les processus cellulaires dans lesquels peut intervenir le quorum sensing sont divers, comme par exemple la

bioluminescence, la formation de biofilms, la compétence ou la production d'antibiotiques, mais les plus étudiés ont trait à la virulence. Trois systèmes de quorum sensing ont été décrits chez les bactéries à Gram négatif.

5-1. Les systèmes de quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif

5-1.1. Le système HomoSérineLactone/LuxR

Le premier système de quorum sensing nécessite la protéine LuxI, qui est responsable de la production des AHL, ou AI-1, et la protéine LuxR, un activateur transcriptionnel activé par l'autoinducteur. Il a été initialement décrit chez *Vibrio fischeri* chez qui il contrôle l'émission de bioluminescence (Figure 26).

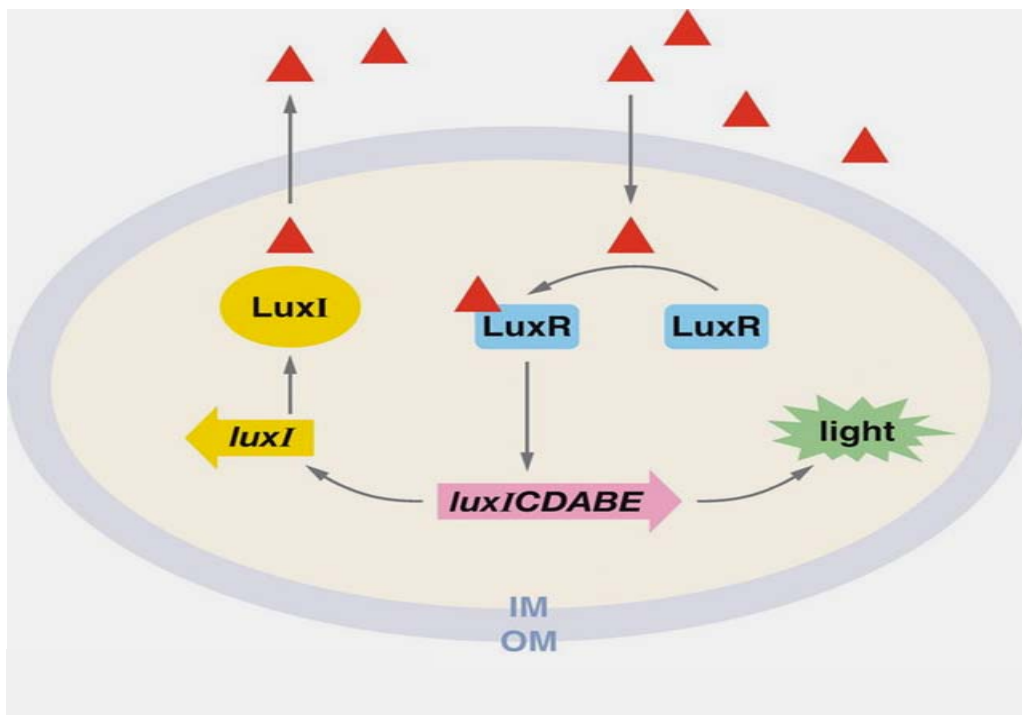


Figure 26 : Mécanisme de régulation de la bioluminescence chez *V. fischeri*.

L'auto inducteur 1 (triangles rouges) est produit par LuxI, passe par diffusion à travers la membrane et est capté de façon passive par les bactéries où il active LuxR qui en retour, active la transcription de l'opéron *luxICDABE* responsable de la production de bioluminescence (Waters and Bassler, 2005).

Les espèces *Shigella*, *Salmonella* et *E. coli* ne possèdent pas de gène homologue à *luxI* et sont donc incapables de synthétiser une AHL. En revanche, elles possèdent la protéine SdiA homologue aux régulateurs de type LuxR (Ahmer, 2004) qui fixe les AHL (Yao *et al.*, 2005). Ces espèces bactériennes pourraient donc être capables de moduler leur expression génique en réponse à des HSL produites par d'autres espèces, mais cela n'a pas encore été clairement

démonstré. Chez *E. coli* il semble que l'indole, produit de dégradation du tryptophane, puisse se substituer aux AHL pour activer SdiA (Lee *et al.*, 2007b).

5-1.2. Le système LuxS/AI-2

Le système LuxS-AI-2 a été originellement décrit comme un système de quorum sensing inter espèces (figure 27).

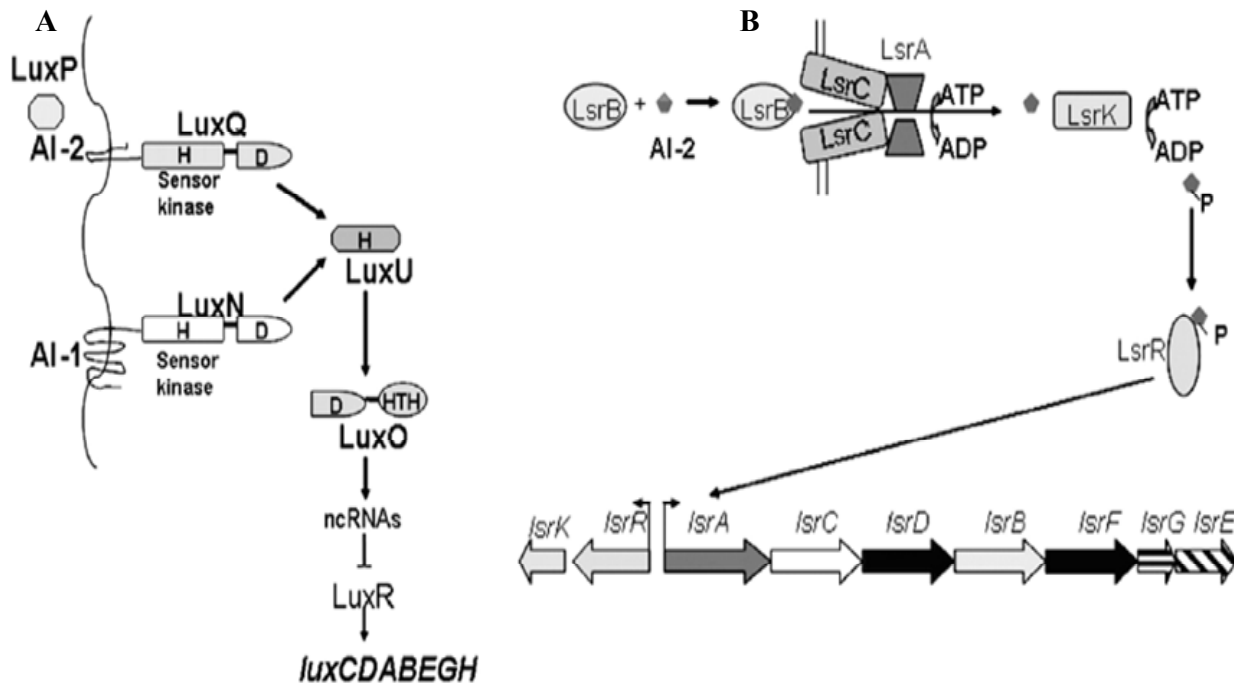


Figure 27 : Régulation par le système LuxS/AI-2 chez *V. harveyi* et *E. coli*

(A) Chez *V. harveyi*, AI-2 se fixe sur LuxP. Ceci active l'activité phosphatase de LuxQ, conduisant à la déphosphorylation de LuxU et LuxO, ce qui permet l'expression de LuxR et l'activation de l'opéron luciférase. (B) Import de l'AI-2 par l'ABC transporteur Lsr chez *E. coli* et *Salmonella*. Les gènes *lsrACDBFGE* sont transcrits en opéron, tandis que *lsrK* et *lsrR* sont transcrits dans le sens inverse. Une fois AI-2 fixé, il est transporté dans la cellule par l'ABC transporteur Lsr, phosphorylé par LsrK, interagissant probablement avec LsrR et levant la répression de l'opéron *lsr*. (Walters *et al.*, 2006)

AI-2 est un furanosyl-borate diester dérivé de la S-Adosylmethionine (SAM) et est produit grâce au produit du gène *luxS* qui transforme la S-ribosylhomocysteine (SRH) en 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandione (DPD) qui est le précurseur de l'AI-2 (Schauder *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006) (figure 28). AI-2 est produit en phase exponentielle de croissance et sa production par *E. coli* est augmentée en présence de glucose et réprimée en présence d'AMPc. Son importation dans la cellule a lieu lors de la phase stationnaire de croissance et est augmentée en conditions limitantes de glucose (Hardie *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Le gène *luxS* est présent chez un grand nombre de bactéries dont le génome a été séquencé au moins partiellement (tableau 6), ce qui laisse penser que ce système de

communication inter-espèces est très largement répandu au sein des écosystèmes microbiens (Federle and Bassler, 2003). Chez *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, l'AI-2 est importé dans la cellule bactérienne par un ABC transporteur codé par l'opéron *lsr* (figure 28) dont l'expression est elle-même régulée par l'AI-2 (Taga *et al.*, 2001; Neilson *et al.*, 1970).

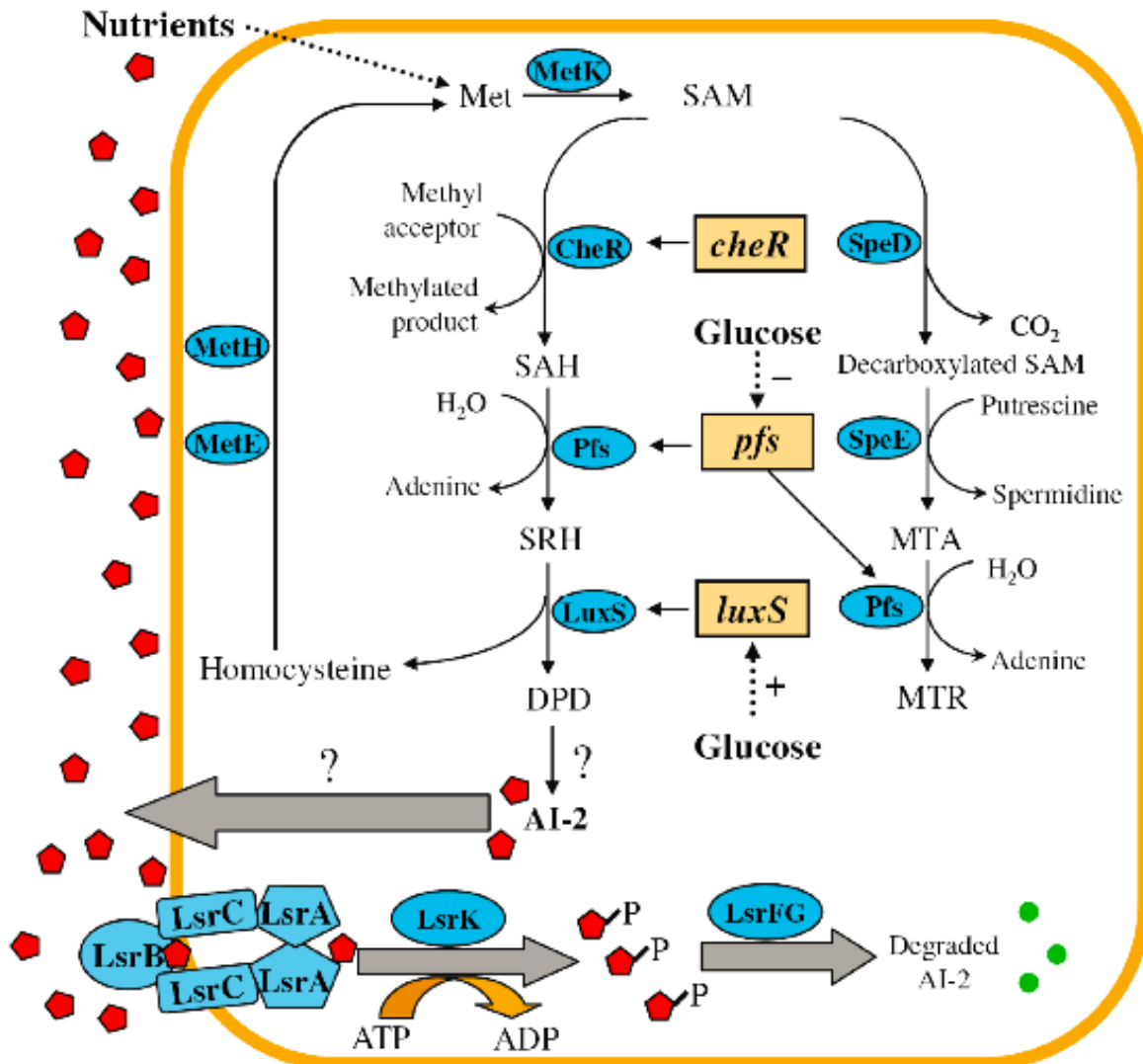


Figure 28 : Voies de biosynthèse et d'internalisation de l'AI-2 chez *E. coli*.

La méthionine est transportée à l'intérieur de la cellule où elle est transformée en S adénosyl méthionine (SAM) par la Methionine kinase (MetK). SAM est catabolisée par 2 voies: D'une part par la voie de biosynthèse des polyamines où elle d'abord décarboxylée par le produit du gène *speD*. L'autre voie provoque sa transformation en S adénosyl homocystéine (SAH) par l'enzyme CheR. Puis l'enzyme Pfs transforme SAH en S ribosyl homocystéine (SRH) qui est ensuite transformée par le produit du gène *luxS* dont l'expression est induite en présence de glucose, en 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandione (DPD), le précurseur de l'AI-2. Le mécanisme de transformation du DPD en AI-2 n'est pas connu de même que le système d'exportation de cet AI-2. L'AI-2 est transporté dans la cellule par un ABC transporteur composé des protéines LsrB, LsrC et Lsr A. Il est ensuite phosphorylé par LsrK (Li *et al.*, 2006).

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Oceanobacillus ihveysis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>		

Tableau 6 : Espèces bactériennes possédant le gène *luxS* (Federle and Bassler, 2003).

5-1.3. Le système AI-3/épinéphrine/norépinéphrine

Un nouvel auto inducteur, AI-3, dont la nature chimique n'est pas clairement identifiée, a récemment été décrit chez les EHEC. Cet AI-3 biochimiquement distinct de l'AI-2 est produit par les EHEC en phase exponentielle de croissance mais aussi par la flore résidente du tube digestif (Sperandio *et al.*, 2003). Sa synthèse est indirectement altérée par l'inactivation du gène *luxS* (voir ci-dessous). Ni les voies de biosynthèse ni la nature chimique de l'AI-3 ne sont caractérisées. Cependant, la synthèse de l'AI-3 est fortement diminuée dans une souche dont le gène *luxS* est inactivé. Deux voies métaboliques permettent la synthèse d'homocystéine (figure 29). L'homocystéine est nécessaire à la synthèse *de novo* de la méthionine, précurseur de la S-adénosyl méthionine qui joue un rôle clé dans le métabolisme cellulaire. LuxS est impliqué dans l'une de ces voies, convertissant la ribosyl-homocystéine en homocystéine et DPD. La mutation de *luxS* laisse donc active uniquement la seconde voie, qui conduit à la synthèse de l'homocystéine à partir de l'oxaloacétate, ce qui déséquilibre d'autres voies de biosynthèse ou cataboliques d'acides aminés (par ex, l'oxaloacétate est nécessaire pour la synthèse de glutamate et aspartate). La mutation du gène *luxS* possède donc des effets pleiotropes sur la cellule, et l'altération du métabolisme qui en résulte serait à l'origine de la faible synthèse d'AI-3 (Walters *et al.*, 2006). L'AI-3 peut être substitué par des

catécholamines, la norépinéphrine et l'épinéphrine, produites en abondance respectivement par les neurones afférents au tube digestif ou par le système nerveux central et déversées dans l'intestin (Sperandio *et al.*, 2003).

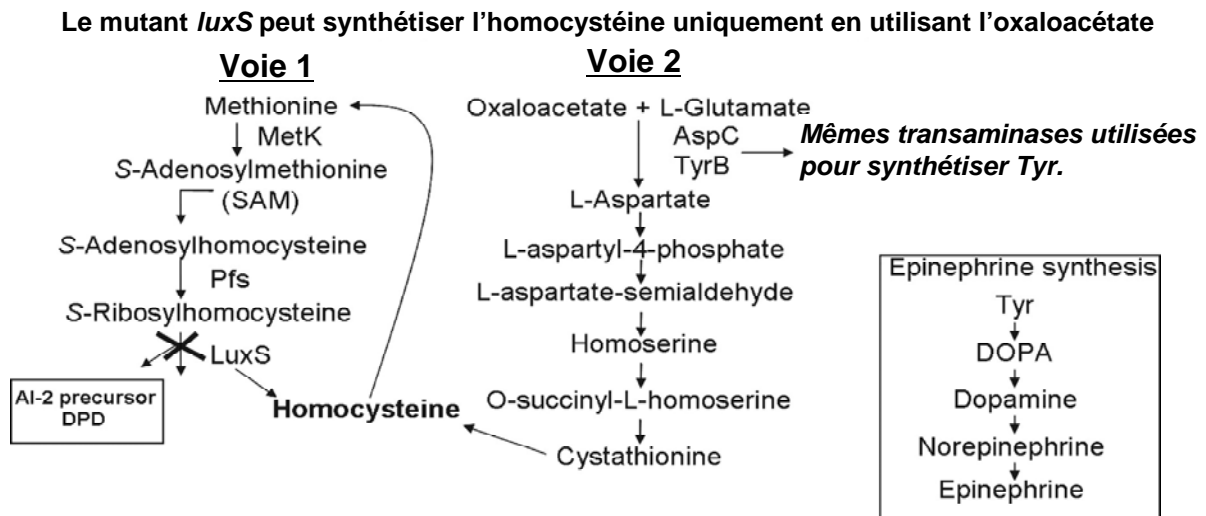


Figure 29 : Voies de biosynthèse de l'homocystéine chez *E. coli*.

L'homocystéine est nécessaire à la cellule pour la synthèse *de novo* de la méthionine. La méthionine est requise pour la synthèse de la SAM. SAM est un important donneur de groupements méthyl impliqués dans la méthylation des lipides, protéines, ARN et ADN. Le mutant *luxS* ne peut pas produire de l'homocystéine par l'hydrolyse de la SRH, ce qui ne laisse à la cellule qu'une seule voie de synthèse de l'homocystéine par l'utilisation de l'oxaloacétate. L'oxaloacétate, le L-glutamate, et les transaminases AspC et TyrB sont utilisées pour produire de l'aspartate, ce qui après une série de réactions mène à la synthèse d'homocystéine. L'utilisation exclusive de cette voie peut conduire à un métabolisme altéré et à un contenu en acides aminés diminué dans le mutant *luxS* ce qui résulterait en une baisse de la synthèse d'AI-3 (Walters *et al.*, 2006).

Plusieurs systèmes de quorum sensing ont été identifiés chez de nombreuses bactéries pathogènes pour les mammifères ou les plantes, et leur implication dans la virulence démontrée (Kaper and Sperandio, 2005) (tableau 7). Ceci montre bien que ces systèmes de communication intra et inter espèces sont largement répandus chez les bactéries et très fortement impliqués dans l'expression de la virulence. Le quorum sensing apparaît donc comme un axe d'étude privilégié pour la compréhension des mécanismes de virulence chez les bactéries pathogènes.

Espèces bactériennes	Système de QS	Autoinducteur(s)	Phénotypes régulé(s)
EHEC et EPEC	Qse/LuxS Lsr/LuxS SdiA	AI-3 AI2 (<i>R</i> -THMF) AHLs (non auto synthétisés)	SSTT, flagelle, et mobilité Captation de AI-2 par Lsr ?
<i>Salmonella</i> sp.	Qse/LuxS Lsr/LuxS SdiA	AI-3 AI2 (<i>R</i> -THMF) AHLs (non auto synthétisés)	? Captation de AI-2 par Lsr, formation de biofilm? Résistance au complément humain (Rck)
<i>Vibrio cholerae</i>	System 1 (CqsA/CqsS) System 2 (LuxS) System 3	CAI-1 AI-2 (furanosyl-borate diester ?) ?	TCP, CT, HA protease, biofilm TCP, CT, HA protease, biofilm ?
EAEC	Qse/LuxS Lsr/LuxS SdiA Other ?	AI-3 AI-2 (<i>R</i> -THMF) AHLs (non auto synthétisés) ?	? ? ? Gènes de virulence régulés par AggR
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cyls FsR LuxS	Cyls Peptide AI-2	Production de cytolysine Gélatinase, serine protease ?
<i>Yersinia</i> sp.	Qse/LuxS Lsr/LuxS YenR/I YpsR /I YtbR/I	AI-3 AI-2 AHLs AHLs AHLs	? ? ? Flagelle, et mobilité Flagelle, et mobilité
<i>Shigella flexneri</i>	Qse/LuxS Lsr/LuxS	AI-3 AI-2	Expression de VirB ? Expression de VirB ?
<i>Campylobacter jejuni</i>	LuxS	AI-2	Mobilité
<i>Vibrio vulnificus</i>	LuxS SmrC	AI-2 (furanosyl-borate diester ?) ?	Protease, hemolysine Protease, hemolysine, virulence
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LuxM, LuxR (OpaR) LuxP, LuxQ, LuxS	AI-1 (AHL ?) AI-2 (furanosyl-borate diester ?)	SSTT ?

Tableau 7 : Différents systèmes de quorum sensing identifiés chez les bactéries intestinales et phénotypes régulés (Kaper and Sperandio, 2005).

5-2. Le Quorum Sensing chez les EHEC.

Chez les EHEC l'expression de plusieurs régulons impliqués dans la virulence est sous le contrôle du quorum sensing, et c'est le système stimulé par l'AI-3 et l'épinéphrine qui semble jouer un rôle majeur (Kendall *et al.*, 2007; Clarke *et al.*, 2006; Reading *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007a).

Il est admis que la dose infectieuse des EHEC est très faible (10 à 50 cellules bactériennes). Par conséquent, les EHEC arrivent généralement peu nombreuses dans le tube digestif, et ne produisent pas assez d'auto inducteurs pour réguler leur expression génique. Il a donc été proposé un modèle dans lequel les gènes de virulence étaient activés par les autoinducteurs produits par les espèces composant le microbiote intestinal et par les catécholamines de l'intestin.

5-2.1. Régulation de la synthèse du flagelle

En 2001, le groupe de Sperandio a mis en évidence une dérégulation de l'expression de l'opéron flagellaire *flhDC* dans un mutant *luxS* (Sperandio *et al.*, 2001). Les gènes du régulon flagellaire sont organisés en 3 classes de gènes : classe 1, classe 2 et classe 3 (Kutsukake *et al.*, 1990). La classe 1 est composée par l'opéron *flhDC* qui régule l'expression des gènes de classe 2, dont fait partie le gène *fliA*. FliA régule l'expression des gènes de classe 3, dont *fliC*. Ce dernier code la flagelline, le composant majeur du flagelle. En 2002 ce même groupe a identifié un système à 2 composants, QseBC, régulé par le quorum sensing (Sperandio *et al.*, 2002). QseC est le senseur de l'AI-3 et de l'épinéphrine, et QseB le régulateur transcriptionnel (figure 30). La norépinéphrine se fixe directement sur QseC et provoque sa phosphorylation. Le groupement phosphate de QseC est ensuite transmis à QseB qui ainsi activé induit la transcription de l'opéron *flhDC* (Clarke *et al.*, 2006). La mutation de *qseC* inhibe presque entièrement la transcription de *flhDC*, la production de flagelline, et la mobilité bactérienne ; QseB active la transcription des gènes de l'opéron *flhDC* en se fixant directement sur leur région promoteur (Sperandio *et al.*, 2003; Sperandio *et al.*, 2002; Clarke and Sperandio, 2005b; Clarke and Sperandio, 2005a). L'expression des gènes *qseBC* est elle-même sous le contrôle de l'AI-3 (Clarke and Sperandio, 2005a; Clarke *et al.*, 2006).

Le quorum sensing a donc un effet positif sur la mobilité des EHEC via l'AI-3, mais SdiA et l'indole ont une action négative sur la synthèse des flagelles. En effet, il a été montré qu'une surexpression de SdiA inhibe la transcription de *fliC* chez les EHEC (Kanamaru *et al.*, 2000) et que l'indole inhibe la mobilité et la formation de biofilm (Lee *et al.*, 2007a). L'indole, contrairement à l'AI-3, est produit en phase stationnaire de croissance (Wang *et al.*, 2001), et SdiA peut être activé par l'indole (Lee *et al.*, 2007b). Ces 2 régulations antagonistes peuvent intervenir séquentiellement lors de l'infection par les EHEC. En phase exponentielle de croissance, AI-3 est produit, le flagelle est synthétisé, les EHEC deviennent donc plus mobiles afin d'atteindre plus rapidement l'épithélium intestinal où ils adhèrent et pourraient former des biofilms. En phase stationnaire de croissance, les EHEC, sous l'effet de l'indole, perdraient leur capacité à adhérer et à former des biofilms pour se détacher et aller coloniser un autre site.

5-2.2. Régulation de la formation des lésions d'attachement effacement

5-2.2.1. Régulation de l'expression du LEE

Le LEE, responsable de la formation des lésions AE par les EHEC, est composé de 5 opérons majeurs : *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE5* et *LEE4* (figure 9). Il code pour un système de sécrétion de type III (TTSS), une adhésine (intimine) et son récepteur transloqué dans la cellule hôte par le TTSS, des protéines effectrices qui perturbent la signalisation cellulaire (voir chapitre 2-2.1). La régulation de l'expression du LEE est très complexe et fait intervenir un grand nombre de régulateurs spécifiques, tels que Ler, GrlR, GrlA, AivF, EtrA, et de régulateurs globaux, tels que H-NS, IHF, Hha, GadE (Mellies *et al.*, 2007) (voir chapitre 2-2.1).

Le quorum sensing contrôle l'expression des opérons *LEE1*, *LEE2* et *LEE3* en activant l'expression de *ler*, premier gène du *LEE1* codant un activateur transcriptionnel du LEE (Sperandio *et al.*, 1999). La transcription de *ler* est activée par un régulateur (QseA) appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels LysR (Sperandio *et al.*, 2002). Cette régulation du LEE par le quorum sensing est sous le contrôle du système AI-3/Norépinephrine/Epinephrine (figure 30).

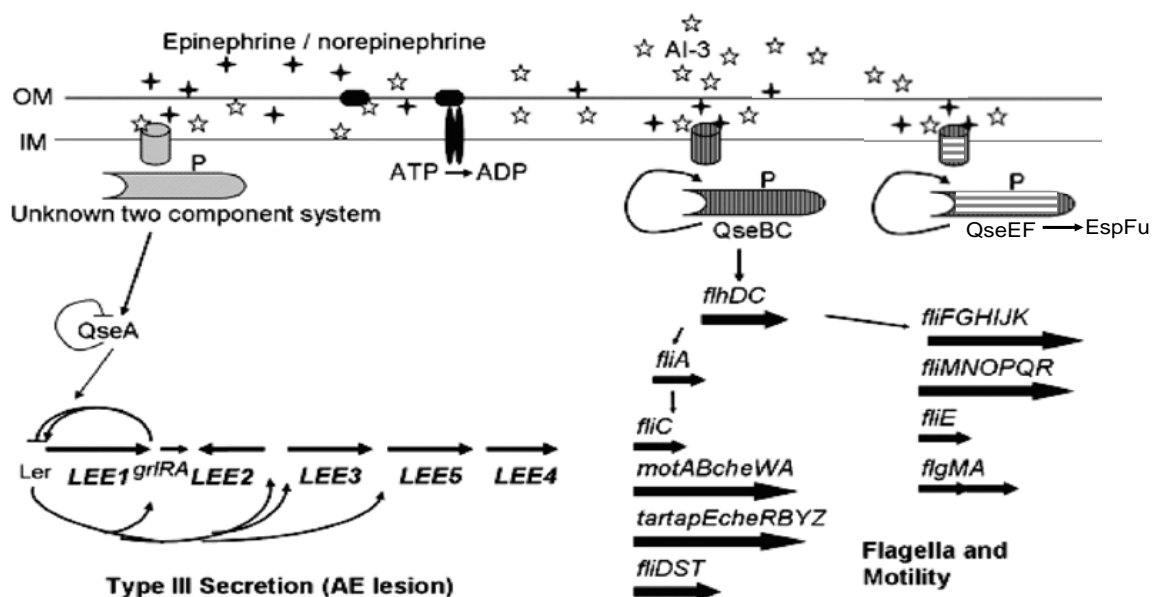


Figure 30 : Modèle de régulation de l'expression des gènes du flagelle et du LEE par l'AI-3.

L'AI-3 et l'épinephrine/norépinephrine semblent être reconnus par le même récepteur et interagissent avec des kinases à l'intérieur du périplasme. Le senseur QseC fait partie du système à 2 composants qui régule le régulon flagellaire. Il est supposé qu'un autre système à 2 composants reconnaît le signal et active la transcription des gènes du LEE. QseA régule l'expression du LEE en activant la transcription de l'opéron *LEE1*. Le senseur QseE appartenant au système à 2 composants QseEF, régule l'expression de *espFu* et participe au remodelage de l'actine (Reading *et al.*, 2007).

L'expression de *qseA* est régulée au niveau transcriptionnel par le quorum sensing, mais à l'heure actuelle le récepteur du signal extracellulaire (AI-3/Norépinephrine/Epinephrine) activant la transcription de *qseA* n'est pas identifié. QseA active directement la transcription de *ler* en se fixant en amont du promoteur distal P1 de l'opéron *LEE1* et en interagissant avec un autre facteur encore inconnu. Ce facteur se fixerait quant à lui sur une région plus en amont sur la région promotrice de *LEE1* (Sharp and Sperandio, 2007). QseA active aussi indirectement, par le biais d'un facteur inconnu, l'expression de l'opéron *grlRA* situé entre *LEE1* et *LEE2* et ceci indépendamment de *ler* (Russell *et al.*, 2007).

De manière identique à la régulation du flagelle, il existe vraisemblablement une régulation antagoniste du LEE par SdiA. En effet, une surexpression de SdiA provoque une inhibition de la transcription de l'opéron *LEE4*, ce qui laisse supposer qu'en phase stationnaire de croissance, quand SdiA est activé par des AHL ou l'indole, il inhibe l'expression de certains gènes du LEE. Ceci aurait pour conséquences de limiter l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales et de favoriser, soit la colonisation d'un autre site dans l'intestin, soit l'excrétion de la bactérie pour permettre la colonisation d'un autre hôte (Kanamaru *et al.*, 2000).

5-2.2.2. Régulation de l'expression de *EspFu*

Récemment un nouveau système à 2 composants a été identifié chez les EHEC comme étant vraisemblablement régulé par le quorum sensing, plus précisément par le système AI-3/Norépinephrine/Epinephrine. En effet, l'épinephrine active la transcription des 2 gènes codant chacun des composants. Ce système à 2 composants est codé par les gènes *yfhK* et *yfhA* rebaptisés depuis *qseE* et *qseF* respectivement (Reading *et al.*, 2007). Ces gènes sont sous-exprimés dans le mutant *luxS* (Sperandio *et al.*, 2001). QseE est le senseur du signal, enchâssé dans la membrane, et QseF est le régulateur activé par QseE (figure 30). Ce système régule positivement la transcription du gène *espFu* codant EspFu (ou Tccp), un facteur spécifique des EHEC nécessaire au remodelage de l'actine qui conduit à la formation des piédestaux sous les EHEC, provoquant des lésions AE (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel QseF active la transcription de *espFu* n'est pas connu car il a été montré que QseF ne se fixait pas directement à la région promotrice du gène *espFu*.

Cette découverte d'une régulation de la formation de lésions AE par l'épinephrine/norépinephrine est corroborée par le fait que les antagonistes β -adrénergiques bloquent la formation de ces lésions (Sperandio *et al.*, 2003).

5-2.2.3. Régulation de la synthèse de Stx2

Les études concernant la régulation de la production de Stx2 par le quorum sensing sont contradictoires.

L'hormone norépinéphrine a une capacité de facteur de croissance pour les bactéries à Gram⁻, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Y. enterocolitica* (Lyte M. and Ernst S., 1993; Belay and Sonnenfeld, 2002; Freestone *et al.*, 2007). En fait, les EHEC produisent sous l'influence de la norépinéphrine un autoinducteur de croissance (Lyte *et al.*, 1996b). Cet autoinducteur, en plus de son effet sur la croissance des EHEC, augmente d'environ 2 fois la production de Shiga toxine (Voigt *et al.*, 2006). Une analyse du transcriptome de la souche EDL 933 montre que l'exposition prolongée (5 h) à la norépinéphrine augmente l'expression des gènes *stx1* et *stx2* (Dowd, 2007). Cependant, l'effet positif sur la croissance des EHEC n'a été observé que dans un milieu particulier, le SAPI, qui contient du sérum bovin, et pas en LB ou en DMEM (Lee *et al.*, 2007a; Sperandio, communication personnelle). En milieu LB, l'addition d'épinéphrine ou de norépinéphrine n'a aucun effet sur l'expression des gènes *stx* (Lee *et al.*, 2007a). Par ailleurs, plusieurs études ont été réalisées sur un mutant *luxS*. Ainsi, un mutant *luxS* produit *in vitro* moins de Stx2 que la souche sauvage (Sperandio *et al.*, 2001; Jeon and Itoh, 2007). Cependant, il n'apparaît aucune différence de production de Stx2 entre la souche sauvage et le mutant *luxS* chez des souris axéniques (Jeon and Itoh, 2007). A l'aide d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur tardif du phage *stx2* (pR', qui contrôle l'expression de *stx2*) et le gène *lacZ*, il a été montré que l'expression de *stx2* est réprimée dans le mutant *luxS* (Sperandio *et al.*, 2001). Cependant, cette répression de l'expression de *stx2* n'a pas été retrouvée dans une étude transcriptomique globale comparant l'expression génétique de la souche sauvage et du mutant *luxS* (Kendall *et al.*, 2007). De plus, l'exposition du mutant *luxS* à l'AI-2, l'AI-3, ou l'épinéphrine réprime l'expression de *stx2* (Kendall *et al.*, 2007), ce qui est contradictoire avec les études précédentes montrant un effet inducteur ou une absence d'effet.

Pour tenter d'expliquer ces contradictions, on peut émettre certaines réserves concernant la pertinence des procédures avec lesquelles ont été obtenus ces résultats. En effet, les études de Lyte montrant que la quantité de toxine produite en présence de norépinéphrine est 100 fois plus importante qu'en absence de cette hormone montrent aussi que la différence de croissance des bactéries est de l'ordre de 3 Log (Lyte *et al.*, 1996a), ce qui peut laisser supposer que l'augmentation de la quantité de toxine produite est due à l'augmentation de la quantité de bactéries productrices, et non à une induction de la synthèse. Dans la plupart des

études, les méthodes de dosage de Stx2 ne sont pas très précises (Western blot, titration...), et les différences de concentration en Stx2 sont relativement faibles, ce qui met en cause leur significativité. Les différences de milieu utilisé (SAPI, LB, DMEM), de culture (phase de croissance, bactéries adhérentes ou en suspension), de souches, de méthode d'analyse, peuvent également expliquer les différents résultats obtenus.

En conclusion, les études portant sur l'effet du quorum sensing sur la production de toxine Stx2 par les EHEC sont loin de montrer de manière irréfutable que le quorum sensing est effectivement impliqué, et si tel est le cas par quel système (AI2, AI3 ?). Par conséquent, d'autres études méritent d'être menées afin d'infirmier ou de confirmer les précédentes observations.

MATERIEL ET METHODES

Souches utilisées

Les souches utilisées au cours de notre étude font partie d'une collection d'environ 350 souches collectées avant 2001. La grande majorité des souches sont d'origine bovine, seule une cinquantaine d'entre elles ont été isolées de cas cliniques en Europe, au Japon et aux Etats-Unis. Pour notre étude, nous avons choisi 42 souches (tableau 8). Nous avons aussi utilisé 4 souches mutantes EDL 933 Δ *stx2*, EDL 933 Δ *stx1*, EDL 933 Δ *stx1* Δ *stx2* qui ont été obtenues au laboratoire, et Sakai Δ *stx1* Δ *stx2* qui nous a été donnée par C. Sasakawa.

Les souches bactériennes du microbiote intestinal testées pour leur pouvoir d'inhibition sont listées dans le tableau 9.

Construction de mutants

Les mutants EDL 933 Δ *qseA*, EDL 933 Δ *qseC* et EDL 933 Δ *luxS* ont été obtenus par la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Brièvement, une cassette portant le gène de résistance à la kanamycine est amplifiée dans la souche *E. coli* CH158 au moyen d'amorces qui contiennent dans leur région 5' 50 paires de bases (pb) correspondant à la séquence du gène à muter. Ce produit d'amplification après purification sur colonne (QiaQuick, Qiagen) est électroporé dans une souche EHEC EDL 933 possédant un plasmide (pKobeg) portant un gène codant une recombinase sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose. Après culture en présence de 1 mM d'arabinose, la souche EDL 933 a donc produit des recombinases qui vont permettre une recombinaison homologue entre la cassette « kanamycine » et le gène que l'on veut déléter. On élimine ainsi le gène cible de la première à la dernière base. Le mutant isogénique obtenu est criblé sur boîte LB + Kanamycine et la mutation est irréversible. Pour réaliser le double mutant Δ *speB* Δ *speC*, nous avons fait un premier échange allélique avec la cassette kanamycine, puis un second avec une cassette chloramphénicol.

Souche*	Sérotype	<i>stx</i> ₂ genotype [†]	<i>stx</i> ₁ [‡]	Origine [§]	Séropathotype	Référence#
*86-24	O157:H7	<i>stx</i> ₂	N	H/épidémie	A	T. Whittam
CH1898	O157:H7	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2c}	N	H/SHU	A	V. Livrelli
*CHVi-I	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	N	H/SHU	A	V. Livrelli
*Sakai	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/épidémie	A	T. Whittam
*EDL 933	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	viande/épidem.	A	(O'Brien <i>et al.</i> , 1983)
CHO75	O157:H7	<i>stx</i> ₂	N	H/SHU	A	V. Livrelli
A8993-CS2	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/SHU	A	T. Whittam
*85-08	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/D	A	T. Whittam
93-111	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/épidémie	A	T. Whittam
*NV95	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	P	B	A	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV203	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV253	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV254	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV166	O113:H21	<i>stx</i> _{2c}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV170	O113:H21	<i>stx</i> _{2c}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV297	O113:H21	<i>stx</i> _{2c} <i>stx</i> _{2-vhb}	P	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV298	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV299	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV300	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	P	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV302	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV237	O113:H21	<i>stx</i> ₂	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*E-D226	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vhb}	N	H	C	A. Caprioli
*CL-15	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/SHU	C	T. Whittam
*DEC16A	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/D	C	T. Whittam
*CL-3	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/SHU	C	T. Whittam
*87-307	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/SHU	C	T. Whittam
*NV148	O91:H10	<i>stx</i> _{2-vha}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV271	O91:H10	<i>stx</i> _{2c}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV280	O91:H10	<i>stx</i> _{2c}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV130	O91:H10	<i>stx</i> _{2c} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV199	O91:H10	<i>stx</i> _{2c} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV308	O91:H10	<i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*CB6775	O91:H10	<i>stx</i> ₂	N	H	C	L. Beutin
*E-D76	O91:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	P	H	C	A. Caprioli
*87-2927	O91:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	P	H/SHU	C	T. Whittam
*VTH-13	O91:H21	<i>stx</i> ₂	P	H/CH	C	J. Blanco
*B2F1	O91:H21	<i>stx</i> _{2-vha} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/SHU	C	(Ito <i>et al.</i> , 1990)
*NV200	O91:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV197	O91:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
*NV127	O91:H21	<i>stx</i> _{2c} <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV32	O91:H21	<i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV74	O91:H21	<i>stx</i> _{2-vhb}	P	B	C	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)

Tableau 8 : Caractéristiques des souches STEC utilisées

*Souche utilisée lors des expérimentations de PCR quantitative et ELISA

†Variants en gras sont activables par le mucus

‡ N, absence du gène *stx*₁; P, présence du gène *stx*₁

§ H: souche d'origine humaine; SHU: isolée d'un cas clinique de SHU; CH: isolée d'un cas clinique de colit hémorragique; D: isolée d'un patient avec symptômes diarrhéiques; B: souche d'origine bovine

Les souches fournies par T. Whittam ont été commandées sur <http://shigatox.net>

Espèces bactériennes	Associations
<i>Roseburia faecis</i>	<i>R. faecis</i> + <i>B. stercoris</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>B. breve</i> + <i>R. faecis</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>B. stercoris</i>
<i>Ruminococcus calidus</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>B. breve</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>R. calidus</i>
<i>Clostridium leptum</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>R. faecis</i>
<i>Clostridium coccooides</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>C. leptum</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>C. coccooides</i>
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>L. reuteri</i>
	<i>B. thetaio.</i> + <i>C. leptum</i> + <i>C. coccooides</i>
	<i>B. thetaio.</i> + <i>B. breve.</i> + <i>L. reuteri</i>
	<i>B. thetaio.</i> + <i>R. faecis</i> + <i>B. stercoris</i>

Tableau 9 : Liste des espèces bactériennes ayant servi à conditionner le milieu CC et testées pour leur pouvoir d'inhibition de la synthèse de Stx2.

Milieus et conditions de culture

Lors de notre étude, les souches ont été cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) à 37 °C sous agitation orbitale de 185 rpm. Pour l'extraction de l'ADN génomique, chaque souche a été repiquée à partir d'un stock en LB + glycérol 20% conservé à -20 °C dans 5 ml de LB frais. La période d'incubation a été de 16 h.

Afin de tester la cytotoxicité des surnageants des souches STEC sur les cellules Vero, nous avonsensemencé 5 ml de LB par les bactéries provenant d'un stock LB + glycérol 20% conservé à -20°C. Après 20 h de préculture à 37°C sous agitation, 5 ml de LB frais ont étéensemencés avec 25 µl de la préculture et incubés pendant 16 h à 37 °C sous agitation orbitale de 185 rpm. A la fin de la période d'incubation, les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes à 5000 x g et le surnageant est filtré au moyen d'un filtre 0,2 µm (Sartorius, Palaiseau, France). Ce surnageant est utilisé pour tester la cytotoxicité et pour un dosage de Stx2.

Pour étudier la production de toxine Stx2 avec et sans induction du système SOS, les souches ont été cultivées en milieu LB ou DMEM à 37 °C sous agitation orbitale de 185 rpm. Après 16 h de préculture à 37 °C sous agitation, 7 ml de LB ou de DMEM ont étéensemencés avec 35 µl de la préculture et incubés à 37 °C sous agitation orbitale de 185 rpm jusqu'à obtenir une DO à 600 nm (DO₆₀₀) comprise entre 0,2 et 0,3. Cette condition remplie, la culture est divisée en 2 ; 3 ml de culture seront mis en contact avec la MC (Sigma-Aldrich,

Saint Quentin Fallavier, France) à une concentration finale de 250 ng/ml. Les 3 ml restant ne subissent aucun traitement. Les 2 cultures sont ensuite remises à incuber à 37 °C sous agitation.

Pour tester l'effet des polyamines ou de la norépinéphrine, la souche EDL 933 a été cultivée en milieu DMEM (ref 1880 Invitrogen). Après une préculture en DMEM à 37 °C sous agitation de 225 rpm pendant 16 h, EDL 933 a étéensemencée dans un milieu DMEM frais à une DO₆₀₀ de 0,02. La norépinéphrine est ajoutée dès le début de la culture tandis que la spermine est ajoutée lorsque la densité optique a atteint la valeur de 0,1. Les cultures sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation à 225 rpm. Les courbes de croissance sont réalisées par mesure de la densité optique à 600nm à intervalles réguliers. 1 ml de culture est prélevé à différents temps. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 x g, les surnageants sont filtrés au moyen d'une seringue équipée d'un filtre 0,2 µm. Les culots sont resuspendus dans 750 µl de Tri Reagent® (BMC).

Les milieux élaborés à base de contenus cécaux de rats axéniques (GFC) et de rats à flore humaine (HMC) ont été obtenus de la manière suivante : Les contenus cécaux des rats ont été centrifugés 30 minutes à 7 000 x g puis filtrés successivement au moyen de filtres 0,45 et 0,2 µm. Le liquide obtenu a ensuite été dilué au demi dans une solution minérale (composition en annexe I). Du glucose 40% (p/v) a ensuite été ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,2%. Le pH a ensuite été ajusté à 7 par ajout de NaOH 10N. Ces milieux de culture ont servi de milieux de culture à la souche EDL 933 à 37°C sous agitation 225 rpm. La croissance de la souche a été suivie par numération sur boîte LB agar par la technique des spots à intervalles réguliers. 1 ml de culture a été prélevé à différents temps. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 x g, les surnageants ont été filtrés au moyen d'une seringue équipée d'un filtre 0,2 µm. Les culots ont été resuspendus dans 750 µl de Tri Reagent®.

La souche EHEC EDL 933 a été cultivée à 37 °C sous agitation à 225 rpm dans le milieu CC contrôle et conditionné par les flores fécales ou par les espèces bactériennes intestinales. Les courbes de croissance sont réalisées par mesure de la densité optique à 600 nm à intervalles réguliers. 1 ml de culture a été prélevé à différents temps. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 x g, les surnageants ont été filtrés au moyen d'une seringue équipée d'un filtre 0,2 µm. Les culots ont été resuspendus dans 750 µl de Tri Reagent®.

Mesure de l'activité cytotoxique envers les cellules Vero

Les cellules Vero sont des cellules rénales de singe vert d'Afrique. Elles ont été cultivées à 37 °C sans CO₂ dans du milieu EMEM (INVITROGEN, CERGY PONTOISE, FRANCE) additionné de 10% (Vol/Vol) de sérum de veau fœtal (SVF, MERCK EUROLAB, STRASBOURG, FRANCE),

1% de glutamax (INVITROGEN, CERGY PONTOISE, FRANCE), 1% de vitamines (INVITROGEN, CERGY PONTOISE, FRANCE), de pénicilline G (100 U/ml), de streptomycine (100µg/ml), et d'amphotéricine B (0,25 µg/ml) (milieu EMEM complet). Les cellules sontensemencées dans des plaques à fluorescence Fluoronunc (NUNC, ROSKILDE, DANEMARK) à raison de 10⁵ cellules par puits.

L'activité cytotoxique des surnageants de culture a été mesurée par dosage de la Lactate Déshydrogénase (LDH) relarguée par les cellules en nécrose. La mesure de la LDH a été réalisée au moyen du kit CytoTox-One™ Homogenous Membrane Integrity Assay (PROMEGA, MADISON, USA). La LDH libérée par les cellules ayant une membrane endommagée est mesurée avec un système enzymatique couplé qui provoque la conversion d'un composé : la résazurine, en résorufine fluorescente. La résorufine fluorescente est ensuite dosée par spectrophotométrie à fluorescence.

Les cellules Vero sontensemencées sur des plaques 96 puits noires à raison de 10⁵ cellules par puits (50 µl à 2 x 10⁶ cellules/ml). 50 µl de surnageant de culture des souches bactériennes dilué au 1/100^{ème} dans du milieu EMEM complet est appliqué sur les cellules. Le surnageant de chaque souche est testé en triplicat. Un contrôle négatif est réalisé en testant la cytotoxicité induite par le surnageant de la souche DH5α. La libération spontanée de LDH est évaluée en triplicat par l'ajout sur les cellules de 50 µl de EMEM complet ne contenant pas de surnageant de culture bactérienne. Le relargage maximum de LDH est évalué en triplicat par l'ajout, après 24 h à 37 °C, de 2 µl d'une solution de lyse sur 100 µl de cellules Vero à 10⁶ cellules/ml. Après 24 h à 37 °C, les plaques sont équilibrées à 22 °C (température optimale d'activité de la LDH) puis 100 µl de réactif CytoTox-One™ sont ajoutés à chaque puits. Après une incubation de 10 min à 22 °C, 50 µl de solution stop sont ajoutés et la fluorescence est mesurée au lecteur *flx800* (BIO-TEK INSTRUMENTS, WINOOSKI, USA) à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La moyenne des trois valeurs de fluorescence obtenues pour chaque souche est calculée, les valeurs des relargages spontané et maximum sont calculées et la valeur de la cytotoxicité pour chaque souche est obtenue par la formule suivante :

$$\frac{\text{libération expérimentale} - \text{libérationspon tan ée}}{\text{libération maximum} - \text{libérationspon tan ée}} \times 100$$

Echantillons fécaux

4 sujets sains (2 hommes et 2 femmes) âgés de 3 à 36 ans ont pris part à l'étude. Leur régime alimentaire consiste en un régime occidental standard. Aucun d'entre eux n'a reçu d'antibiotiques durant les 3 mois précédant l'étude et aucune maladie gastro-intestinale n'a

été diagnostiquée pour aucun d'entre eux. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique régional.

Les fécès fraîchement récoltés ont été obtenus de chacun des sujets et conservés en conditions anaérobies à 4 °C (anaerocult; Merck, Darmstadt, Germany) et utilisés dans les 12 h. 1 gramme de l'échantillon fécal a été dilué 10 fois (p/v) dans une solution minérale anaérobie (composition en annexe I) et homogénéisé par agitation magnétique. Des dilutions décimales sériées ont été réalisées jusqu'à une dilution de 10^{-5} .

Obtention des rats à flore humaine

12 rats Fisher 344 adultes mâles et 12 femelles provenant de l'élevage du laboratoire ont été utilisés. Ils naissent axéniques et sont élevés en conditions stériles. Les rats étaient âgés de 12 semaines au début de l'expérimentation. Ils ont été séparés en 3 groupes de 8 animaux en 3 isolateurs stériles. Dans chaque isolateur les rats ont été maintenus par paire en cage macrolon standard. Ils avaient un accès libre à de l'eau stérile et à un régime (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) stérilisé par γ irradiation à 40 kGy (IBA Mediris, Fleurus, Belgium). Pour reproduire la diversité d'un régime humain, la nourriture contenait des lipides et des protéines d'origine animale et végétale ainsi que du sucrose et de l'amidon cuit (Lan et al., 2007). Au cours de l'étude, les isolateurs ont été maintenus dans des conditions contrôlées de lumière (08.00-19.00 h), de température (20-22°C) et d'humidité (45-55%).

Les dilutions fraîches (10^{-3}) des échantillons fécaux de 2 hommes sains (36 et 3 ans) ont été transférées dans les isolateurs et inoculées aux rats par inoculation intra gastrique (1ml par rat). Nous avons ainsi obtenu 2 groupes de 8 rats colonisés par chacun des 2 microbiotes. Le troisième groupe a été inoculé avec 1 ml d'une solution minérale anaérobie stérile et utilisé comme contrôle. Les rats ont été élevés pendant 2 semaines pour permettre l'implantation correcte de la flore et l'adaptation au nouvel état floral. Au jour 15 les rats à flore humaine et les rats axéniques utilisés comme contrôle ont été euthanasiés par asphyxie au CO_2 et les ceca ont été prélevés.

Conditionnement des milieux

Le milieu CC de Leedle et Hespell (Leedle and Hespell, 1980) (composition donnée en annexe I) a été conditionné de la manière suivante : d'une part, 1 ml des dilutions 10^{-4} ou 10^{-5} de chaque flore fécale a servi à inoculer 40 ml de milieu CC. D'autre part, 1ml de culture pure de chaque espèce bactérienne fécale a servi à inoculer 40 ml de milieu CC. Après 24 h d'incubation à 37 °C sous anaérobie stricte en utilisant les techniques d'anaérobie décrites par Hungate (Hungate, 1969), les cultures ont été centrifugées à 7000 x g pendant 30 minutes et les surnageants ont été filtrés par des filtres de 0,2 μm . Les nutriments ont été ajustés par ajout

de LB 20X (composition en annexe I) à une concentration finale de 0,5X. Le pH été ajusté à 7 par ajout de NaOH 10N et les milieux ont été à nouveau filtrés par filtre de 0,2 µm. Les milieux obtenus sont appelés milieux CC conditionnés. Ces milieux et le milieu CC non conditionné ont été utilisés comme milieux de culture pour la souche EDL 933 à 37 °C sous agitation à 225 rpm.

Les milieux LB et DMEM ont été conditionnés suivant le protocole décrit par Sperandio (Sperandio *et al.*, 1999). Brièvement, après une préculture de 18 h à 37 °C en DMEM ou LB sous agitation, une dilution au 1/100 de la préculture a été réalisée dans du DMEM ou du LB frais et la culture a été incubée à 37 °C sous agitation jusqu'à une densité optique de 0,2. Cette culture a alors été à nouveau diluée au 1/100 dans du DMEM ou du LB frais et incubée jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1,2. Après centrifugation 5 min à 12 000 x g et filtration 0,45 µm les nutriments ont été ajustés par ajout de LB 20X à une concentration finale de LB 0,5X et le pH à été ajusté à 7 par ajout de NaOH 10N.

Extraction de l'ADN génomique des STEC

L'ADN génomique des souches a été extrait par une technique de lyse par la chaleur. Après une culture de 16 h en milieu LB sous agitation, 1,5 ml de culture est centrifugé à 7500 x g pendant 6 minutes. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans 1 ml d'eau. La suspension est centrifugée 6 minutes à 7500 x g. Le culot est repris dans 500 µl d'eau et placé 10 minutes au bain marie à 95 °C. Le lysat bactérien ainsi obtenu est ensuite centrifugé pendant 6 minutes à 7500 x g et le surnageant contenant l'ADN est prélevé et conservé à -80 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

Typage des variants *stx2*

Les différents variants *stx2* ont été typés par la technique de RFLP-PCR décrite par Tyler *et al.* (Tyler *et al.*, 1991). L'ADN des souches à typer a tout d'abord subi une PCR avec les amorces Vte-A et Vte-B (séquence et conditions de PCR en annexe II). Ces amorces amplifient spécifiquement le variant *stx2_e*. Puis un couple d'amorce (annexe II) est utilisé pour amplifier, sans distinction, un fragment de 285 pb de 8 variants différents de *stx2* à partir de l'ADN génomique de la souche à typer. S'il y a lieu, *i.e.*, si la souche possède l'un de ces 8 variants, le fragment de PCR est digéré par 3 enzymes de restriction différentes, *RsaI*, *NciI* et *HaeIII*, qui donnent des profils de digestion différents en fonction du variant. Ceci nous a permis de discriminer les variants *stx2-933*, *stx2-vha* (*stx2d1*), *stx2-vhb* (*stx2d2*) et *stx2-NV206* (annexe II).

Le cas échéant, pour discriminer les 2 variants *stx2-vha* et *stx2_c* nous avons développé une nouvelle procédure de RFLP-PCR. Les 2 variants *stx2-vha* et *stx2_c* sont identiques pour leur

sous-unité B, mais ne partagent que 98,6% d'homologie nucléotidique pour leur sous-unité A. Par conséquent nous avons amplifié un fragment de 530 pb de la sous-unité A. Ce fragment a ensuite été digéré par l'enzyme *EcoRV* qui possède un site de restriction uniquement dans le variant *stx_{2c}* ce qui donne un profil de restriction avec un fragment de 329 pb et un fragment de 201 pb (voir section résultats). La combinaison de ces 2 RFLP-PCR permet de déterminer précisément la nature du ou des variants *stx2* présents dans le génome des souches qui composent notre étude.

Les 2 variants Stx2-vha et Stx2-vhb sont activables par l'élastase du mucus. La présence du site de clivage protéique est corrélée à la présence d'un site de restriction pour l'enzyme *PstI* sur l'ADN codant la sous unité A de la toxine (Jelacic *et al.*, 2003). La région génomique où se situe ce site a été amplifiée par PCR avec les amorces SLT-II-vc et CKS2. L'amplicon de 890 pb obtenu est ensuite digéré par l'enzyme *PstI* pendant 2 h à 37 °C. La présence du site de restriction *PstI* se traduit par l'obtention de 2 fragments de 504 et 386 pb dans le cas d'un variant non activable, alors que les variants activables ne sont pas coupés (Jelacic *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2006; Gobius *et al.*, 2003).

Dosage de la toxine Stx2 par ELISA

Le dosage de la toxine Stx2 a été réalisé par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et plus précisément par ELISA dit « sandwich ».

L'anticorps de capture utilisé est un anticorps monoclonal de souris STX2-BB12 dirigé contre la sous-unité B de la toxine Stx2 (Toxin Technology Saratosa USA). Il a été dilué au 1/500^{ème} dans un tampon carbonate-bicarbonate (composition donnée en annexe III). Cet anticorps a ensuite été adsorbé sur une plaque de 96 puits Maxisorp™ (Nunc, Wiesbaden, Allemagne) à raison de 100 µl par puits pendant une nuit à 4 °C. Après élimination du tampon carbonate-bicarbonate, les sites de fixation aspécifiques ont été saturés par une solution de saturation (composition en annexe III) à raison de 200 µl par puits pendant 30 min à 37 °C. Pendant ce temps, les échantillons sont dilués dans un tampon de dilution (composition en annexe III). Chaque échantillon est dilué sur une colonne d'une plaque de 96 puits en polystyrène ne fixant pas les protéines (Nunc, Wiesbaden, Allemagne). Dans le premier puits de la colonne, l'échantillon est déposé pur ou dilué au 1/10^{ème} dans le cas d'une culture en présence de MC. Des dilutions sériées au ½ sont réalisées jusqu'à une dilution finale de 1/128 ou 1/1280. Une gamme de dilution de toxine purifiée est réalisée pour standard. La toxine Stx2 purifiée (Toxin Technology Saratosa USA) à une concentration de 0,25 µg/µl est d'abord diluée au 1/10^{ème} dans le tampon de dilution (solution mère), puis 2 séries de dilution au ½ sont réalisées à partir de cette solution mère : une première à partir d'une dilution au

1/30^{ème} de la solution mère et la seconde à partir d'une dilution au 1/40^{ème}. Nous obtenons ainsi une gamme étalon dont la concentration en toxine Stx2 s'étend de 833 ng/ml à 104 ng/ml. Après la saturation, la plaque MaxisorpTM est lavée 3 fois avec un tampon de lavage (composition en annexe III). La gamme est ensuite déposée en duplicat sur les 2 premières colonnes à raison de 100 µl par puits ; le dernier puits de chaque colonne est rempli de 100 µl de tampon de dilution, pour établir le blanc de la plaque et le zéro de la gamme de dilution. 100 µl des dilutions d'échantillon sont ensuite déposés dans les 10 colonnes restantes. La plaque est ensuite laissée à incuber pendant 2 h à 37 °C. Après l'incubation, la plaque est lavée 3 fois avec le tampon de lavage. Une solution d'anticorps polyclonal anti Stx2 de lapin dilué au 1/2000^{ème} est déposée sur la plaque (100 µl par puits) et la plaque est laissée à incuber pendant 1 h 30 à 37 °C. A la fin de l'incubation, 3 lavages sont réalisés et 100 µl/puits d'une solution d'anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à la peroxydase GAR-HPO (Pierce, Rockford USA) dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon de dilution sont déposés sur la plaque. La plaque est ensuite incubée pendant 45 minutes à 37 °C. A la fin de cette incubation, 3 lavages sont réalisés. Une solution de substrat peroxydase (Stable Peroxydase substrate, Pierce) et OrthoPhénylène Diamine (OPD, Sigma Saint Quentin Fallavier France) 0,2 mg/ml préparée à l'abri de la lumière est déposée sur la plaque (100 µl/puits). La coloration est développée à l'abri de la lumière pendant 2 minutes et la révélation est arrêtée par ajout de 50 µl/puits de H₂SO₄ 2N. La densité optique de la coloration est ensuite lue dans un spectrophotomètre à plaque µQuant (Biotek, Colmar France) à 492 nm. La concentration en toxine Stx2 des échantillons est calculée par l'équation de la courbe standard en ayant pris soin au préalable de choisir un point dont la DO est située dans la zone linéaire de la courbe.

Extraction des ARN

- Extraction par le kit RNeasy

Après 3 h de culture en absence ou en présence de MC, les bactéries sont culotées par centrifugation 10 min à 7500 x g. Le surnageant est récupéré et filtré à 0,2 µm et sera utilisé plus tard pour les dosages de Stx2 en ELISA. Le culot est quant à lui repris dans 100 µl d'une solution de TE-lysozyme (400 µg/ml) afin de lyser les parois bactériennes. La suite de l'extraction est faite en suivant scrupuleusement les instructions du kit RNeasy (Qiagen). Nous avons cependant ajouté une étape de digestion à la DNase sur la colonne comme indiqué par le fournisseur et en utilisant le kit de DNase spécialement conçu (RNase free DNase set Qiagen). Après extraction les ARN sont dosés par mesure de l'absorbance à 260/280 nm en plaque de 96 puits UVstar (Greiner) et dans le lecteur de plaque µQuant (Biotek).

- Extraction par le Trizol

Lors de nos études sur l'effet de la norépinéphrine et du microbiote intestinal, les ARN ont été extraits par la méthode d'extraction au Trizol (phénol-chloroforme).

- Reprise le culot dans 750 µl de Trizol (TriReagent)
- Lyse des cellules à température ambiante pendant 10 minutes.
- Ajout de 0,2 volume de Chloroforme (par rapport au volume initial de TRIZol) et agitation pendant 30 secondes et décantation pendant 10 minutes.
- Centrifugation 15 minutes à 12000 x g à 4 °C.
- Prélèvement de la partie aqueuse supérieure et ajout de 0,5 ml volume d'isopropanol. Agitation lente afin de mixer les 2 fractions et décantation pendant 10 minutes.
- Centrifugation 10 minutes à 12000 x g à 4 °C.
- Elimination du surnagent et resuspension du culot contenant les ARN par un volume d'éthanol 75% dans de l'eau traitée au DEPC.
- Centrifugation 10 minutes, à 7500 g à 4 °C.
- Elimination du surnageant et séchage du culot.
- Dissolution les culots dans 30 µl d'eau DEPC pendant 10 minutes à 56 °C.
- Mesurer la DO à 260 et 280 nm en lecteur de plaque µQuant : [ARN] (µg/µl) = $(DO_{260} \times 40 \times \text{facteur de dilution}) / 1000$

Transcription inverse des ARN en ADNc

Après dosage 1 µg d'ARN est utilisé pour la reverse transcription par la transcriptase inverse SuperScript™ II (Invitrogen). 1 µg d'ARN est donc dilué dans de l'eau « RNase free » de manière à avoir 1 µg dans 11,5 µl final. 3 µg d'amorces aléatoires (Random primers Invitrogen) est ajouté à chaque échantillon. Le mélange est incubé ensuite 10 minutes à 65 °C.

Puis à chaque échantillon nous ajoutons

- 1 µl de DNTPs 10 mM (Roche)
- 4 µl de First Strand Buffer 5X (Invitrogen)
- 2 µl de DTT 0,1M (Invitrogen)
- 0,5 unités de SSII SuperScript™ II.

Chaque échantillon subit ensuite le traitement suivant : 50 minutes à 42 °C
15 minutes à 70 °C

PCR quantitative

Après rétro-transcription, les ADNc ont été quantifiés par PCR quantitative. Nous avons choisi la méthode de quantification absolue. Pour cela nous avons dû créer des courbes standard des gènes que nous voulions quantifier, en l'occurrence *stx₂*, *stx_{2-vha}*, *stx_{2-vhb}*, *stx_{2c}*, *recA* et le gène de ménage *tufA*.

Obtention des courbes standard

La première étape consiste à amplifier par PCR le gène dont nous voulons établir une courbe standard. Pour cela, nous avons utilisé un couple d'amorce (tableau 8) qui amplifie une région d'environ 880 pb du gène d'intérêt. Dans le cas du gène *stx₂*, ces amorces sont universelles à tous les variants et amplifient une région couvrant les 600 derniers nucléotides du gène *stx_{2A}* et l'intégralité de la séquence codant pour la sous-unité B (884 pb). Pour amplifier le variant *stx₂* nous avons utilisé l'ADN de la souche VTH 13 qui ne possède que ce variant et qui ne possède pas *stx₁*. L'ADN de la souche NV 95 a été utilisée comme matrice pour l'amplification du variant *stx_{2c}*, la souche NV237 a été utilisée comme matrice pour le variant *stx_{2-vhb}*. Du fait de la remarquable similarité existant entre les 2 variants *stx_{2c}* et *stx_{2-vha}*, une seule courbe standard a été faite pour ces 2 variants. Les gènes *recA* (909 pb) et *tufA* (872 pb) ont été amplifiés à partir d'ADN génomique de la souche EDL 933. Après amplification des gènes, le produit de PCR est purifié sur colonne (Strataprep™, Stratagene, Amsterdam, Hollande) puis quantifié par mesure de la DO à 260 nm en spectrophotomètre pour microplaque μ Quant en diluant 2 μ l de produit d'amplification purifié dans 98 μ l d'eau dépourvue de DNase et RNase.

A la quantité d'ADN obtenue est appliquée la formule :

$$\frac{6,01 \cdot 10^{23} \times [ADN] (g / \mu l)}{660 (ADN \text{ double brin}) \times \text{taille de l'amplicon (pb)}}$$

qui donne le nombre de molécules d'ADN/ μ l.

Les produits d'amplification sont ensuite dilués dans les volumes appropriés d'eau pour obtenir une solution mère de $5 \cdot 10^9$ molécules/ μ l. A partir de cette solution mère, des dilutions décimales sériées sont réalisées, afin d'obtenir une gamme de dilution allant de $5 \cdot 10^8$ à 5 molécules/ μ l. 2 μ l de ces dilutions servent de matrice pour une PCR quantitative avec les amorces spécifiques du variant *stx₂* correspondant (tableau 8). La PCR quantitative est réalisée dans l'appareil LightCycler® de Roche. L'amplification est réalisée en utilisant le kit LightCycler Faststart DNA Master SYBR green I (Roche). Les conditions de PCR sont données en annexe IV. L'amplification est ensuite analysée en utilisant le logiciel LightCycler Data Analysis. La courbe standard ainsi obtenue est visualisable et l'efficacité de la PCR peut

être évaluée en utilisant la pente de la droite de régression. La pente correspond à $P=(b-a)/(\log Q_b - \log Q_a)$ avec Q_a : quantité de matrice au cycle a et Q_b : quantité de matrice au cycle b. En théorie on doit avoir $Q_n = Q_i \times 2^n$ pour n : nombre de cycles. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre $Q_n = 10 \times Q_i$ peut être calculé ainsi :

$$10 \times Q_i = Q_i \times 2^n \rightarrow 2^n = 10 \rightarrow n \log 2 = 1 \rightarrow n = 1/\log 2 = 3,32$$

Donc en théorie pour une dilution d'un facteur 10 la pente minimale est de 3,32 c'est-à-dire qu'il faut au moins 3,32 cycles de plus pour amplifier une quantité 10 fois moindre. Dans la réalité, la quantité de matrice n'est pas multipliée par 2 à chaque cycle mais par $1 + \text{efficacité}$. C'est ainsi que l'on définit l'efficacité de la PCR. La pente est donc fonction de l'efficacité de la PCR : $\text{Pente} = 1/\log(1 + \text{Eff})$ d'où $\text{Eff} = 10^{1/P} - 1$ Donc plus la pente est élevée plus l'efficacité est mauvaise. Nous avons choisi de ne garder les dilutions réalisées que si l'efficacité de la PCR était supérieure ou égale à 95%. Le logiciel donne aussi l'erreur de la PCR qui est due en général au manipulateur. La droite étalon est validée uniquement si l'erreur expérimentale obtenue est inférieure à 10%. Les différentes courbes sont créées et stockées par le logiciel en vue d'une utilisation lors de la quantification des échantillons.

Quantification des ADNc *stx2* et *recA*

Après retro-transcription, les ADNc sont à une concentration de 10 ng/ μ l. Pour la quantification des ADNc *stx2* et *recA*, les ADNc totaux sont tout d'abord dilués au $1/20^{\text{ème}}$ puis 2 dilutions décimales sériées sont réalisées pour obtenir 3 solutions contenant 0,5 , 0,05 et 0,005 ng/ μ l d'ADNc qui servent de matrice à une PCR quantitative réalisée dans les mêmes conditions que les courbes standard (tableau 8). Chaque échantillon est donc quantifié en triplicat et à chaque PCR le gène d'intérêt (*stx2* ou *recA*) et le gène de ménage (*tufA*) sont quantifiés afin de s'affranchir de la variabilité inter réactions.

Quantification des particules phagiques

La quantification des particules phagiques a été réalisée de manière indirecte par amplification en PCR quantitative de l'ADN phagique. 6 ml de culture sont tout d'abord centrifugés à 12000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est filtré au travers d'un filtre de 0,45 μ m. 5 ml de filtrat sont ensuite traités par 10 μ g/ml RNase A (Amersham) et 40 u/ml DNase I (Amersham) pendant 30 min à 37 °C pour éliminer toute trace d'acides nucléiques non phagique. Les phages sont ensuite sédimentés par ultracentrifugation à 76 000 x g pendant 16 h à 4 °C de 5 ml de filtrat. Le culot est ensuite repris dans 200 μ l de PBS et mis à bouillir à 95 °C pendant 5 min afin de libérer l'ADN phagique. Cet ADN phagique sert ensuite de matrice pour une PCR quantitative dans les mêmes conditions que celles qui sont utilisées pour quantifier les ADNc *stx2* et *tufA*.

Analyses statistiques

Les données obtenues pour le chapitre I sont présentées en tant que Moyenne \pm Erreur standard à la moyenne (SEM). Cette SEM est obtenue en faisant le rapport de l'écart type sur la racine du nombre d'expérimentation (n). Les analyses statistiques ont été réalisées sur les valeurs de chaque expérimentation en utilisant le logiciel SAS v8.1. Les variables indépendantes considérées ont été l'origine des souches, le variant *stx2* et le sérotypage. Le nombre de souches n'étant pas identique pour chacun des groupes, nous avons réalisé une analyse de variance en utilisant les modèles linéaires généraux. Nous avons utilisé la méthode de comparaison des moyennes de Ryan-Einot-Gabriele-Welsh avec un ajustement par paires selon la méthode de Tukey. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative. Les données obtenues lors de l'étude de l'effet du microbiote intestinal sur la production de toxine Stx2 (Chapitre III) sont présentées en tant que Moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée par un test *t* standard. Les échantillons ont été considérés comme non appariés et nous avons utilisé un test bilatéral.

Dot-Blot Stx2

Les surnageants de cultures des EHEC filtrés sont dilués dans un tampon de dilution PBS-BSA 1g/l. Les facteurs de dilution utilisés sont dépendants des conditions de cultures des échantillons. 2 μ l des dilutions choisies sont ensuite déposés sur une membrane (TransBlot transfer medium Biorad). Après 2 minutes d'absorption, la membrane est saturée par une solution de PBS-lait (annexe III) pendant 2 h à température ambiante. Après élimination de la solution de saturation, la membrane est incubée avec une solution d'anticorps polyclonal de lapin anti Stx2 dilué au 1/2000 dans une solution de PBS-lait (annexe III) pendant 18 h à 4 °C sous agitation à 180 rpm. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec une solution de lavage (composition en annexe III), puis elle est incubée avec une solution d'anticorps de révélation de chèvre anti anticorps de lapin couplé à la peroxydase (GAR-HRP) dilué au 1/5000 dans une solution de PBS-lait (annexe III) pendant 2 h à 4 °C sous agitation 180 rpm. La membrane est ensuite lavée 2 x 5 min et 1 x 15 min avec la solution de lavage, puis séchée 5 minutes à température ambiante. 3 ml d'une solution de révélation pour western-blot (ECL Western-blotting substrate Pierce) sont ajoutés sur la membrane. La membrane est ainsi incubée pendant 5 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution de révélation est ensuite éliminée et la membrane est enveloppée dans du film Saran. L'autoradiographie est ensuite réalisée sur des films Hyperfilm (GE-Healthcare) exposés pendant 1 min à la membrane.

Dosages de l'AI-3

L'autoinducteur AI-3 a été dosé dans les milieux contrôle et conditionnés par la technique mise au point par Sperandio et au moyen d'une souche reptrice portant une fusion transcriptionnelle promoteur *LEE1-lacZ* (souche TEVS232) (Sperandio *et al.*, 2003). Concrètement, après une préculture de 16 h à 37 °C sous agitation à 150 rpm, la souche TEVS232 estensemencée à une densité optique de 0,02 dans le milieu DMEM contenant une fraction des milieux à tester (10%, 20% ou 50%). Ces cultures sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation à 150 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,08-0,1. Ensuite 100 μ l ou 500 μ l de la culture sont ajoutés à 900 μ l ou 500 μ l respectivement de tampon Z (composition en annexe V). 2 gouttes de chloroforme et 1 goutte de SDS sont ajoutées au mélange afin de lyser les bactéries. Après vortex, la solution est incubée pendant 5 min à température ambiante. Ensuite 200 μ l d'une solution d'Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside (ONPG composition en annexe V) sont ajoutés et le mélange est incubé a température ambiante jusqu'à ce que la couleur vire au jaune (environ 15 min). La coloration est arrêtée avec 500 μ l de solution d'arrêt (annexe V) puis le mélange est centrifugé à 14000 g afin de culotter les débris bactériens. Le surnageant est prélevé et l'absorbance à 420 nm est mesurée. L'activité β -galactosidase est ensuite calculée par la formule $1000 \times A_{420}/t \times vol \times DO_{600}$ avec t = temps d'incubation de la solution d'ONPG et vol = 0,1 ml ou 0,5 ml suivant le cas. Le résultat est ainsi obtenu en unités Miller.

RESULTATS

CHAPITRE 1

EXPRESSION DES GENES *STX2* DANS DES SOUCHES STEC DE SEROPATHOTYPE A ET C

RESULTATS

1 - CARACTERISATION DES VARIANTS *STX2*

Notre objectif était de déterminer si la plus grande pathogénicité des souches de séropathotype A comparativement aux souches de séropathotype C pouvait s'expliquer par une production de toxine Stx2 plus abondante, ou par la plus grande cytotoxicité d'un variant particulier de Stx2. Pour y répondre, nous avons sélectionné 49 souches STEC parmi notre collection de 350 souches, et étudié dans un premier temps la répartition des variants *stx2*. 42 souches appartiennent aux sérotypes les plus représentatifs des séropathotypes A et C. Elles ont été isolées soit de bovins sains, soit de cas cliniques, afin d'analyser les différences potentielles entre des isolats d'origine humaine et des isolats du réservoir animal. Au sein d'un même sérotype, nous avons essayé de sélectionner autant de souches d'origine humaine que d'origine bovine. Ceci n'a pas été possible pour le sérotype O157:H7 pour lequel nous ne disposons que de peu de souches non humaines. Nous avons également choisi 7 souches du séropathotype E, de sérotype O6:H10 qui n'a jamais été isolé de malades, et qui nous servent en quelque sorte de témoins non pathogènes. La répartition est la suivante (Tableau 8) : 30 souches isolées de bovins sains ou d'échantillons alimentaires et de sérotypes O157:H7, O113:H21, O6:H10, O91:H10 et O91:H21; 19 souches isolées sur des patients lors d'infections déclarées et réparties dans les mêmes sérotypes hormis O6:H10. Parmi ces souches deux avaient été isolées de diarrhées, deux de colites hémorragiques, huit de syndrome hémolytique et urémique, et quatre d'épidémies. En résumé notre échantillon est composé de 10 souches O157:H7 (9 d'origine humaine, et 1 d'origine bovine), 16 souches de

sérotype O113:H21 (6 souches d'origine humaine et 10 d'origine bovine), 7 souches de sérotype O91:H10 (1 souche d'origine humaine et 6 bovines), 7 souches de sérotype O6:H10 (toutes d'origine bovine), et 9 souches de sérotype O91:H21 (4 d'origine humaine et 5 d'origine bovine). Les proportions de chaque sérotype dans les souches d'origine humaine et dans les souches d'origine bovine reflètent assez bien la réalité. En effet, les souches de sérotype O157:H7 sont plus fréquemment isolées lors d'infections humaines que chez les bovins. En revanche, les souches de sérotype O6:H10 ne sont jamais isolées chez les humains mais uniquement chez les bovins; les souches de sérotype O91:H10 sont quant à elles rarement isolées chez les humains. Les souches de sérotype O157:H7 appartiennent au sérotypotype A, les souches de sérotype O113:H21, O91:H10 et O91:H21 appartiennent au sérotypotype C, et les souches de sérotype O6:H10 appartiennent au sérotypotype E. Si toutes les souches choisies possèdent bien évidemment les gènes *stx2*, certaines possèdent *stx1* et d'autres pas.

Le typage des variants *stx2* a été réalisé par la technique de RFLP-PCR décrite par Bertin en 2001 (Bertin *et al.*, 2001). Cette technique ne permet pas de distinguer les variants *stx2-vha* et *stx2c* dont les séquences nucléotidiques des sous unités B ne sont pas assez polymorphes. Par conséquent, nous avons réalisé un alignement des séquences nucléotidiques des sous-unités A des différents variants présents dans les bases de données (figure 31). Cet alignement a permis de mettre à jour 13 sites de polymorphisme entre les variants *stx2-vha* et *stx2c*. La substitution située à la position 134 (G-A) provoque la disparition du seul site de restriction *EcoRV* présent dans la séquence du variant *stx2c*. Par conséquent, il nous a été possible de mettre au point un nouveau système de RFLP-PCR. Les souches qui possédaient le variant *stx2-vha* ont donc été criblées par cette nouvelle méthode. Les séquences des amorces PT1F et Y2R utilisées pour amplifier un fragment de 533 pb sont données en annexe. Ce fragment recouvre les 195 pb en amont du gène *stx2A* et les 338 pb en 5' de ce gène. La digestion de ce fragment de PCR par l'enzyme *EcoRV* fait apparaître 2 bandes (329 pb et 204 pb) si le variant *stx2c* est présent et une seule si le variant *stx2-vha* est présent. Le cas de figure où 3 bandes sont visibles (*stx2c + stx2-vha*) ne s'est jamais présenté (figure 32).

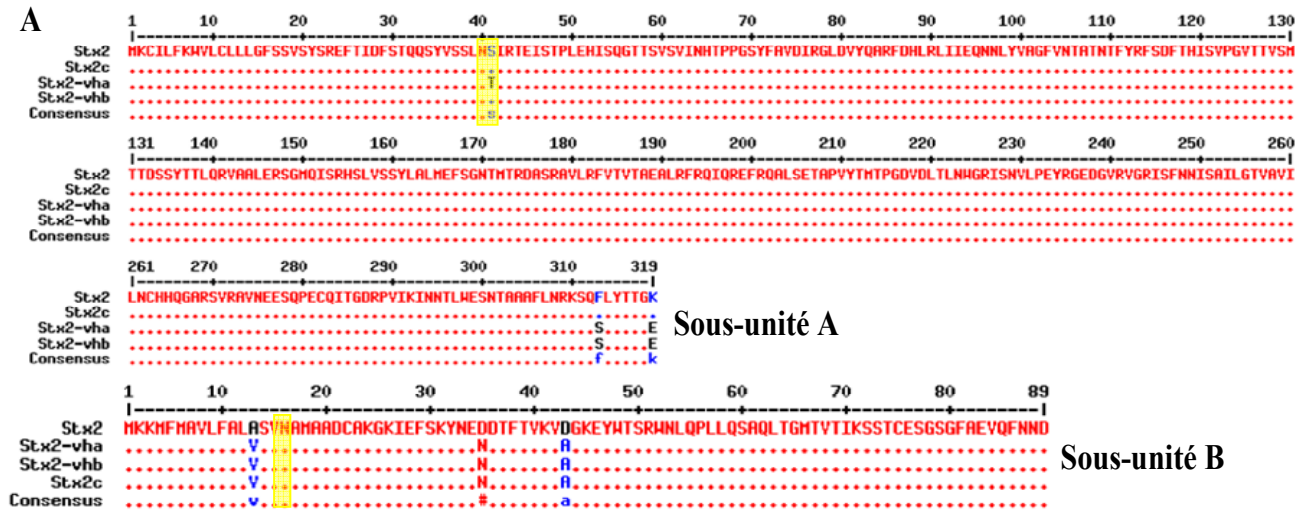


Figure 31 A : Alignements protéiques de différents variants *stx2* dont la séquence est disponible sur Genbank.

Les points indiquent les acides aminés conservés. Les acides aminés évoqués dans la discussion du chapitre I sont entourés en jaune.

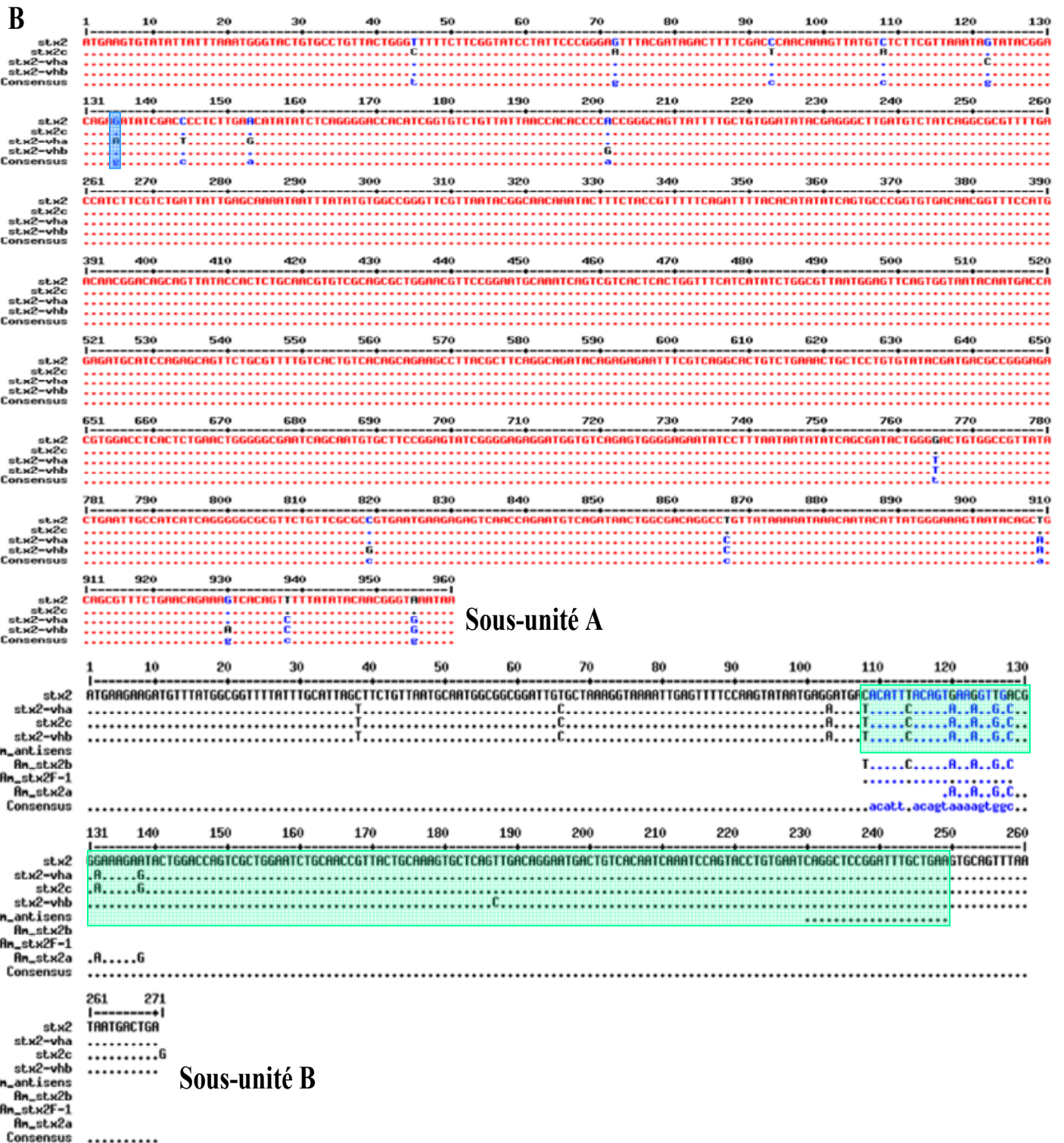


Figure 31 B : Alignements nucléotidiques de différents variants *stx2* dont la séquence est disponible sur Genbank.

Les points indiquent les nucléotides conservés. Le site de restriction *EcoRV* de la sous-unité A utilisé pour le typage des variants *stx2c* et *stx2-vha* est entouré en bleu. Les amorces de PCR quantitative utilisées sont indiquées sur la séquence nucléotidique de la sous-unité B. La zone amplifiée est entourée en vert.

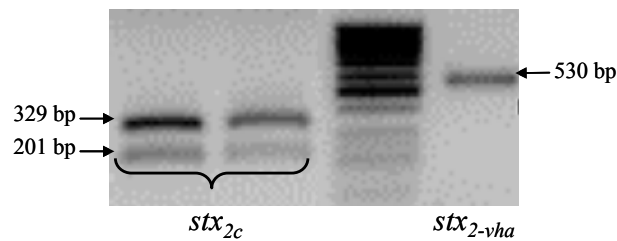


Figure 32 : Caractérisation des variants *stx*_{2c} et *stx*_{2-vha} par RFLP-PCR.

Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments de produits de PCR digérés par *EcoRV*. Le produit d'amplification de 530 pb est coupé en 2 fragments de 329 et 201 pb dans le cas du variant *stx*_{2c} mais n'est pas coupé dans le cas du variant *stx*_{2-vha}.

Parmi les 49 souches étudiées, 29 (60%) ne possèdent qu'un seul variant *stx*₂ et 20 (40%) possèdent 2 variants *stx*₂ différents. Seuls les variants *stx*₂, *stx*_{2-vha}, *stx*_{2-vhb}, *stx*_{2c} et *stx*_{2-NV206} ont été retrouvés dans les souches étudiées (figure 33).

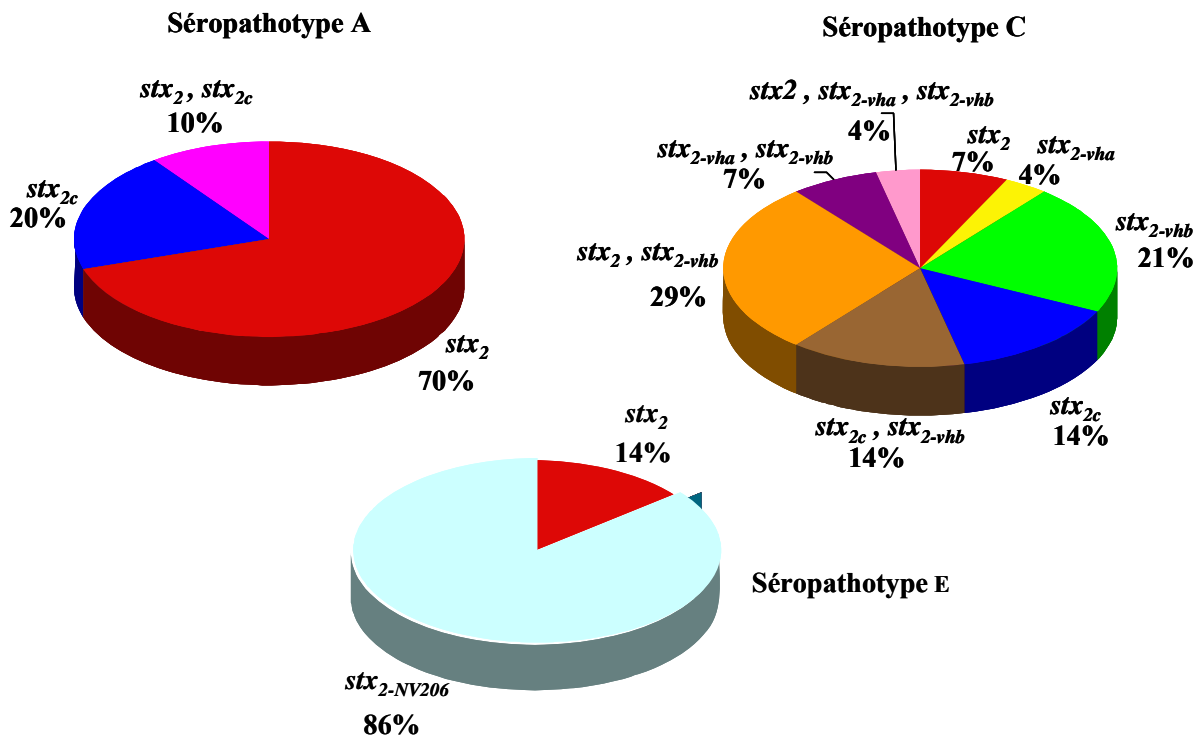


Figure 33 : Répartition des différents variants *stx*₂ parmi les souches de sérotypotype A, C et E.

Chaque variant ou combinaison de variants est représenté dans une couleur différente.

Les variants *stx*_{2e}, *stx*_{2d} et *stx*_{2f} n'ont pas été retrouvés, ce qui n'est pas surprenant étant donné que ces variants sont présents quasi exclusivement chez le porc, le mouton et le pigeon respectivement. Le sérotypotype A, qui regroupe les souches les plus virulentes le plus souvent associées aux épidémies de grande ampleur, présente une faible hétérogénéité de variants. En effet, 70% des souches qui le composent dans notre étude possèdent le variant

stx₂ seul, et 10% des souches possèdent ce même variant associé au variant *stx_{2c}*. Seulement 2 souches (20%) possèdent le variant *stx_{2c}* seul. Le séropathotype C présente une forte hétérogénéité de variants, puisque 8 variants ou combinaisons de variants sont représentés. Le variant le plus fréquemment retrouvé est le variant *stx_{2-vhb}*, seul ou en association avec un ou plusieurs autres variants. Dans ce séropathotype, 54% des souches possèdent plusieurs variants *stx₂*. 60% des souches humaines possèdent le variant *stx₂* seul ou en association, tandis que seulement 22% des souches bovines possèdent ce variant. Le séropathotype E est très homogène. Six souches sur sept possèdent le variant *stx_{2-NV206}*, la dernière portant le variant *stx₂*.

En résumé, l'analyse de la répartition des variants dans notre échantillon montre que le variant *stx₂* est préférentiellement associé aux souches d'origine humaine, puisque 74% d'entre elles le possèdent, et parmi elles il est plus particulièrement associé aux souches de sérotype O157:H7. En revanche, les variants *stx_{2c}*, *stx_{2-vhb}* et *stx_{2-vha}* sont principalement associés aux souches d'origine bovine, en combinaison avec un autre variant dans 48% des cas. Le variant *stx_{2-NV206}* est quant à lui préférentiellement associé aux souches non pathogènes du séropathotype E.

2 - CYTOTOXICITE ENVERS LES CELLULES VERO

Les premières souches STEC ont été décrites à l'origine par leur toxicité envers les cellules Vero (Oku *et al.*, 1989) (d'où leur appellation initiale VTEC, pour Vero toxigenic *E. coli*). Il avait été montré que cette toxicité était due à une Shiga toxine, et que les cellules Vero étaient très riches en récepteur Gb3 (Pudymaitis *et al.*, 1991). Il est généralement admis que la cytotoxicité envers les cellules Vero est corrélée à la pathogénicité de la souche. Bien que cela ne soit pas démontré, il nous a paru intéressant de regarder si la toxicité de nos souches dépendait du variant *stx₂*, du séropathotype, ou de l'origine des isolats. Nous avons donc testé la cytotoxicité envers les cellules Vero de chacune des souches de notre échantillon par dosage de la LDH libérée par les cellules en nécrose ou apoptose. Les expériences contrôles réalisées avec les mutants délétés pour les gènes *stx* des souches EDL 933 et Sakai montrent que la délétion d'un seul gène *stx* ne modifie pas la toxicité comparativement aux souches parentales, alors que la délétion des deux gènes *stx* abolit totalement la cytotoxicité des surnageants de culture.

Il s'avère que toutes les souches STEC ne présentent pas la même cytotoxicité envers les cellules Vero. La première observation que nous avons pu faire est que les souches possédant

stx1 ne sont pas plus cytotoxiques que les souches qui n'ont que *stx2*. De plus, on constate que les souches d'origine bovine présentent une plus forte hétérogénéité en termes de cytotoxicité que les souches d'origine humaine. En effet, la cytotoxicité des souches d'origine bovine varie de 15 à 90 % tandis que la cytotoxicité des souches d'origine humaine varie seulement de 65 à 90 % (figure 34).

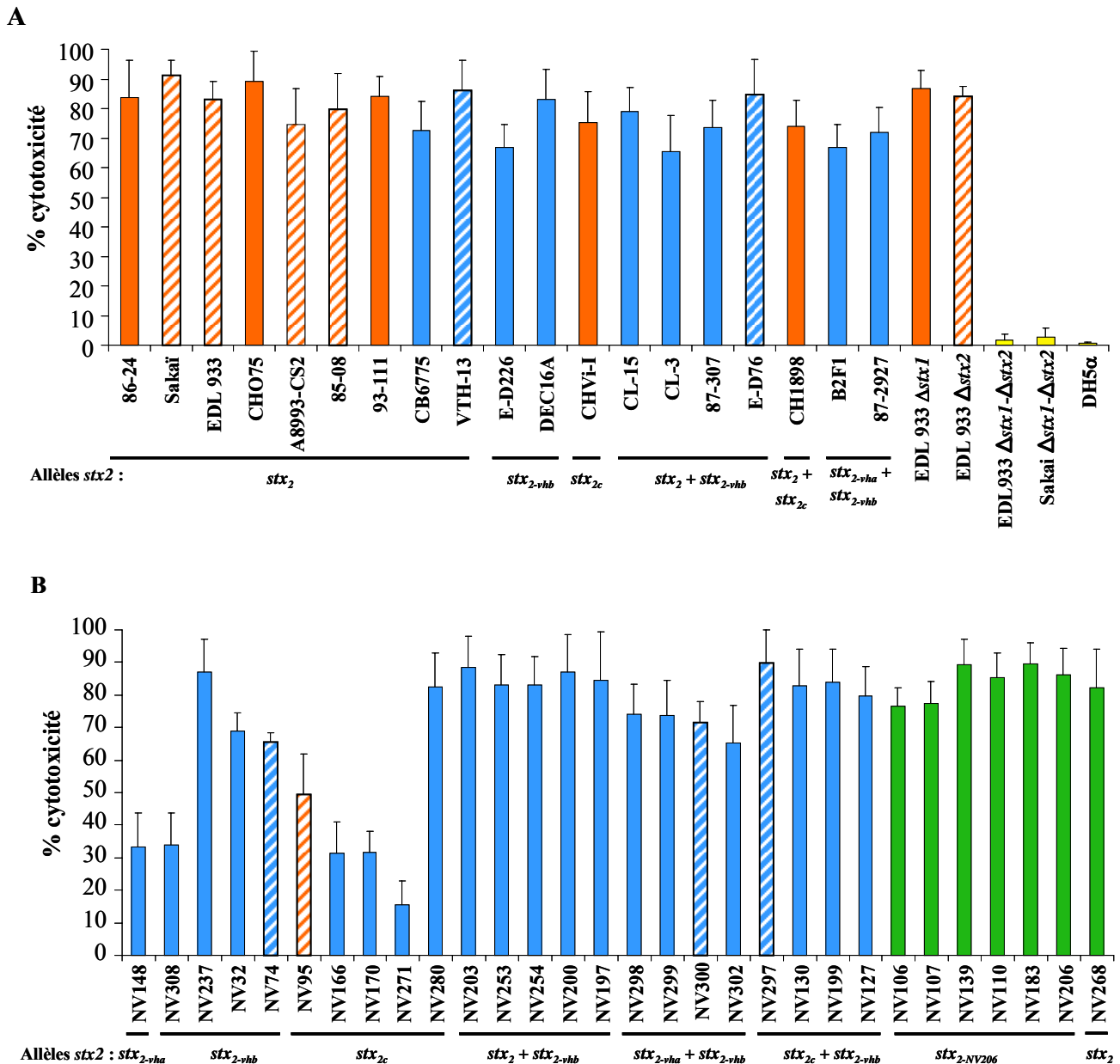


Figure 34 : Cytotoxicité des isolats STEC d'origine humaine (A) et bovine (B).

Les résultats sont exprimés en % de cytotoxicité envers les cellules Vero par rapport à la cytotoxicité d'une solution de lyse (Triton X100). Les valeurs sont les moyennes de 3 expérimentations indépendantes et les erreurs standard à la moyenne (SEM) sont indiquées par les barres d'erreur. Le variant ou la combinaison de variants présent dans chaque souche est indiqué en dessous. Les hachures montrent la présence du gène *stx1*. Les couleurs des barres indiquent l'appartenance au séropathotype A (orange), C (bleu) ou E (vert). La souche *E. coli* K12 DH5α ainsi que les mutants isogéniques des souches EDL 933 et Sakai déléetées des gènes *stx1* et/ou *stx2* ont été utilisés comme contrôles.

Ainsi, les analyses statistiques par test ANOVA révèlent que les souches d'origine bovine sont significativement moins cytotoxiques que les souches d'origine humaine ($P < 0,05$), et ceci malgré le fait que les souches de sérotype O6:H10 soient les plus cytotoxiques. Ce résultat est en réalité dû au fait que les souches de sérotype O91:H10 sont significativement moins cytotoxiques que les souches appartenant aux autres sérotypes.

Le nombre de variants *stx2* n'a pas d'influence sur la cytotoxicité des souches d'origine humaine, mais les souches d'origine animale possédant 2 variants *stx* sont plus cytotoxiques que celles possédant un seul variant ($P < 0,01$). La nature du variant *stx2* semble avoir une influence dans ces conditions. En effet, les souches possédant le variant *stx_{2c}* seul sont significativement moins cytotoxiques que les souches possédant les autres variants, seuls ou en combinaison. Nous avons toutefois observé une grande variabilité de cytotoxicité pour ces souches possédant *stx_{2c}*. En effet, certaines souches (CHVi-I et NV280) sont extrêmement cytotoxiques, alors que d'autres ne le sont que très faiblement (NV166, NV170, NV271, NV95). Par conséquent, il est naturel de se demander si les différences de cytotoxicité observées sont dues à une plus faible production de toxine par les souches les moins cytotoxiques. Nous avons donc mesuré la quantité de toxine présente dans le surnageant ayant servi lors du dosage de la cytotoxicité. Il s'avère que les 2 souches (CHVi-1 et NV280) présentant une forte activité cytotoxique produisent une quantité de toxine (1125 ng/ml et 750 ng/ml respectivement) beaucoup plus importante que les souches faiblement toxiques (NV166 : 100 ng/ml, NV271 : indétectable, NV95 : 203 ng/ml, NV170 : 31 ng/ml). La production de toxine Stx_{2c}, même par les souches les plus cytotoxiques, reste inférieure à la production de toxine Stx₂ par les souches O157:H7. Nous avons par conséquent voulu savoir si les toxines Stx₂ et Stx_{2c} possédaient la même activité cytotoxique. Nous avons donc comparé l'activité spécifique de Stx_{2c} avec celle de Stx₂. Pour cela, nous avons dilué le surnageant de culture des 2 souches 86-24 et CHVi-I, possédant respectivement les variants Stx₂ et Stx_{2c}, de façon à obtenir une concentration égale de toxine dans chacun. Les cellules Vero ont ensuite été mises en présence de différentes dilutions de ces surnageants et la cytotoxicité a été évaluée par coloration du tapis cellulaire au cristal violet. Il s'avère que Stx_{2c} est plus cytotoxique ($CD_{50}/5.10^4$ cellules : 0,07 ng) que Stx₂ ($CD_{50}/5.10^4$ cellules : 0,19 ng). Ainsi, la plus faible cytotoxicité observée pour les souches possédant le variant Stx_{2c} est due à une plus faible quantité de toxine produite et non à faible activité de la toxine.

La seule souche de notre étude à posséder le variant *stx_{2-vha}* est la souche NV148. Elle présente une activité cytotoxique faible (33%) ainsi qu'une faible production de toxine (80 ng/ml). Le variant Stx_{2-vha} présente une $CD_{50}/5.10^4$ cellules de 0,57 ng, ce qui indique une

activité cytotoxique plus faible que celles de Stx2 et Stx2c. La faible cytotoxicité de la souche NV148 peut donc s'expliquer à la fois par une faible production et une faible activité de la toxine.

Les quantités de toxines produites par les souches ne possédant que le variant *stx2-vhb* sont très faibles (116 à 414 ng/ml). Ceci ne nous a pas permis d'obtenir des surnageants contenant suffisamment de toxine pour calculer la CD_{50} de ce variant. Toutefois, la plupart des souches possédant ce variant présentent une cytotoxicité de plus de 65%, et jusqu'à 80%, alors qu'elles ne possèdent pas Stx1 (sauf une). La présence d'une autre toxine a donc été envisagée. Paton *et al.* ont mis en évidence une nouvelle toxine AB_5 : la subtilase présente chez certaines souches O113:H21 (Paton *et al.*, 2004), toxique pour les cellules Vero (Morinaga *et al.*, 2007). Le gène codant cette toxine n'a pas été retrouvé dans les souches en question. La cytotoxicité observée n'est donc pas pour le moment explicable, mais la présence d'une autre toxine active envers les cellules Vero n'est pas à exclure.

Comme nous avons pu le constater, l'analyse de la cytotoxicité des souches envers les cellules Vero s'est avérée peu discriminante, puisque la grande majorité des souches présente une cytotoxicité de 70 à 90 %. Il semble que les cellules Vero soient très sensibles à la toxine, et qu'une concentration de 160 ng/ml soit suffisante pour tuer 80% des cellules. Ainsi, des différences de production de toxine assez importantes ne se traduisent pas toujours par une différence de cytotoxicité, ce qui indique une faible sensibilité du test. Pour obtenir des résultats plus informatifs sur la production de toxine par les différentes souches, il aurait peut être fallu diluer les surnageants encore plus que nous ne l'avons fait (plus de 100x). Mais l'analyse de la cytotoxicité sur cellules Vero présente d'autres inconvénients : il n'est pas possible de faire la part de la cytotoxicité due à Stx1 et à Stx2 pour les souches qui produisent les deux types de Shiga-toxine, ou même éventuellement due à une autre toxine non caractérisée ; pour les souches qui produisent deux variants de Stx2, il n'est pas possible de savoir si un variant est plus produit ou plus cytotoxique que l'autre. Ce test nous renseigne donc de façon approximative sur la cytotoxicité d'une souche, mais très peu sur la production de toxines de la famille Stx2. Devant la lourdeur, les limites, et le manque de reproductibilité de ces expérimentations, nous avons préféré opter pour une autre approche, nous permettant d'analyser plus finement l'expression de chaque variant *stx2*, et ceci en conditions standard de culture, mais aussi lors d'une induction du système SOS. Cette approche permettra de déterminer si les différents variants *stx2* sont portés par des phages inductibles et, le cas échéant, si les taux d'induction sont similaires. De plus, nous analyserons l'expression spécifique des différents variants des gènes *stx2* au niveau transcriptionnel, en conditions

basales et induites. Pour ce travail, nous avons restreint notre contingent de souches à étudier. Nous avons choisi 23 souches sur la base de leur représentativité de sérotype et de combinaisons de variants *stx2* : pour chaque sérotype, nous avons choisi des souches possédant les différentes combinaisons de variants possibles, et provenant de bovins et de cas cliniques (tableau 7). Nous avons éliminé le sérotype O6:H10 qui ne présente pas un grand intérêt pour cette étude puisque composé exclusivement de souches d'origine bovine et possédant un variant qu'on ne retrouve que dans ce sérotype (*stx2-NV206*).

3 - PRODUCTION DE PHAGES *STX2*

Lorsqu'un prophage de type Lambda est induit dans une cellule bactérienne, des protéines phagiques lysent la paroi cellulaire et les phages sont libérés dans le milieu extérieur. La lyse cellulaire se traduit par une diminution de la densité optique de la culture à 600 nm. Il a été montré que plus la diminution de la DO_{600} est importante, plus la quantité de phages produits est grande (Muniesa *et al.*, 2003; Tyler *et al.*, 2004). Pour savoir si des prophages sont induits dans nos souches en réponse à la mise en place d'une réponse SOS, nous avons étudié les cinétiques de croissance des souches en présence ou absence d'un agent alkylant inducteur de la réponse SOS, la MC. Pour déterminer si les phages libérés dans le milieu portent les gènes *stx2*, nous avons développé une méthode spécifique de détection et de quantification.

3-1. Etude de la sensibilité des STEC à la mitomycine C par cinétique de croissance

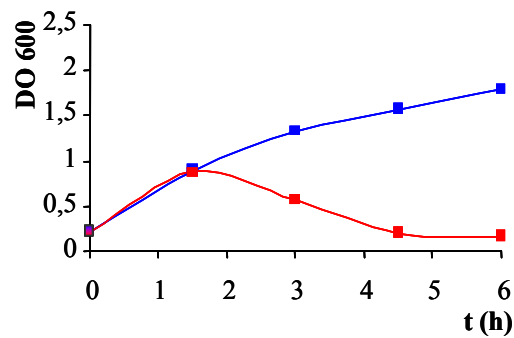
La MC (250 ng/ml) est ajoutée dans la culture bactérienne au début de la phase exponentielle de croissance (DO_{600} : 0,2) comme cela a déjà été décrit (Teel *et al.*, 2002; Ritchie *et al.*, 2003). Cette concentration en MC est suffisante pour induire une réponse SOS et donc une induction du cycle lytique des phages de type λ . Toutes les souches ne répondent pas de la même façon à l'induction par la MC, puisque trois profils de croissance ont été observés (figure 35) :

- Profil a : Les souches subissent une forte lyse très rapidement (87-307, ED 76 et 87-2927). La courbe commence à s'infléchir dès 1h30 après l'ajout de MC. La DO_{600} maximale ne dépasse jamais 1 et tombe toujours à moins de 0.5 après 4 h30 de traitement à la MC.
- Profil b : Les souches présentent une lyse plus tardive et plus progressive (NV237, Sakai, EDL 933, 86-24, 85-08, VTH-13, NV308, CHVi-I, NV95, CL-3, CL-15, NV254, B2F1,

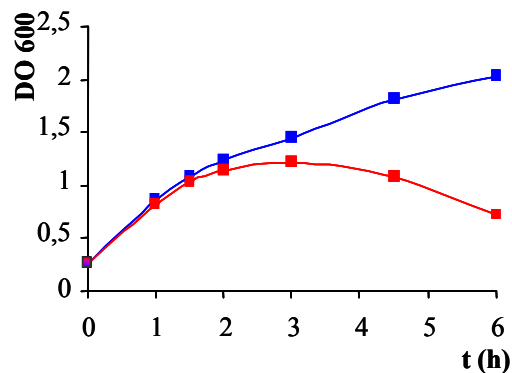
NV199). La DO₆₀₀ commence à diminuer aux alentours de 2 h après l'ajout de MC, reste au dessus de 1 généralement jusqu'à 4 h 30, et ne descend jamais au dessous de 0.5.

- **Profil c** : Les souches ne semblent pas ressentir l'effet de la MC comme en témoigne leur profil de croissance qui montre une très légère baisse du taux de croissance environ 2 h après ajout de MC, mais aucune lyse bactérienne (NV166, NV127, NV148, NV200, DEC16A, ED226, CB 6775).

Profil a : 87-307 (*stx₂-stx₂-vhb*),
ED76 (*stx₂-stx₂-vhb*), 87-2927
(*stx₂vha-stx₂-vhb*)



Profil b : NV237 (*stx₂*), Sakaï (*stx₂*),
EDL933 (*stx₂*), 86-24 (*stx₂*), 85-08
(*stx₂*), VTH-13 (*stx₂*), NV308 (*stx₂-vhb*),
CHVi-I (*stx₂c*), NV95 (*stx₂c*),
CL-3 (*stx₂-stx₂-vhb*), CL-15(*stx₂-stx₂-vhb*),
NV254 (*stx₂-stx₂-vhb*), NV199
(*stx₂c-stx₂-vhb*), B2F1 (*stx-2vha-stx₂-vhb*).



Profil c: NV166 (*stx₂c*), NV148 (*stx₂-vha*),
DEC16A (*stx₂-vhb*), ED-226 (*stx₂-vhb*),
NV127 (*stx₂c-stx₂-vhb*) CB 6775 (*stx₂*),
NV200 (*stx₂ stx₂-vhb*).

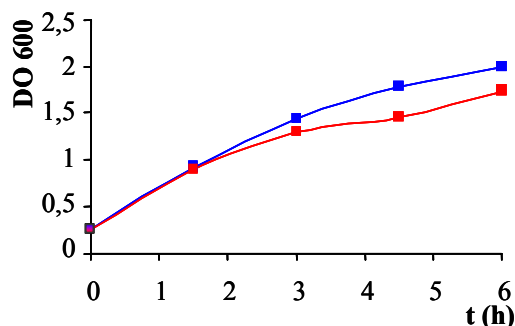


Figure 35 : Courbes de croissance des souches STEC en présence et en absence de mitomycine C.

A t₀, les cultures en LB ont été divisées en deux et la mitomycine C (250 ng/ml) a été ajoutée à l'une d'entre elles. Courbe bleu: croissance en absence de mitomycine C. Courbe rouge : croissance en présence de mitomycine C.

Deux des souches présentant le profil a possèdent la combinaison $stx_2 + stx_{2-vhb}$, la troisième la combinaison $stx_{2-vha} + stx_{2-vhb}$. Les souches du sérotypotype A et celles qui portent le variant stx_2 seul présentent toutes le profil b. Le groupe des souches présentant le profil c est hétérogène, en termes de sérotypes ou de variants, mais aucune de ces souches ne porte le variant stx_2 , que ce soit seul ou en combinaison avec un autre variant. Ainsi, la majorité des souches possédant le variant stx_2 seul ou en combinaison présentent le profil b, ce qui laisse supposer que la nature du variant pourrait avoir une influence sur la sensibilité à la MC.

3-2. Quantification des phages stx_2

Pour déterminer si les diminutions de DO observées étaient corrélées à la production de phages portant les gènes stx_2 , il fallait quantifier les copies de ces gènes dans l'ADN des phages libérés dans les surnageants de culture. Pour cela, nous avons dû mettre au point d'une part une méthode de purification des phages, d'autre part une méthode de PCR quantitative en utilisant des amorces spécifiques de chaque variant.

3-2.1. Isolement des particules phagiques

Nous avons observé, ainsi que d'autres auteurs, que les phages stx perdent très rapidement leur pouvoir infectieux. De plus, si des plages de lyse sont obtenues après infection d'une souche *E. coli* sensible, elles sont extrêmement difficiles à visualiser (Muniesa *et al.*, 2004a). Pour les détecter il est généralement nécessaire de réaliser une hybridation moléculaire avec une sonde spécifique, par exemple du gène stx_2 (Muniesa *et al.*, 2000). Même ainsi nous n'avons pas pu obtenir de résultats reproductibles, et le nombre de plages de lyse était toujours très faible, quelle que soit la souche réceptrice utilisée. Il n'a donc pas été possible de quantifier de façon fiable le nombre de particules phagiques d'un lysat par la technique classique couramment utilisée pour titrer un lysat de phage λ .

Nous avons donc développé une technique de quantification indirecte des phages par PCR quantitative. Après avoir récolté les particules phagiques dans les surnageants de culture par ultracentrifugation, nous les traitons à la DNase et à la RNase afin d'éliminer toute trace d'acides nucléiques bactériens. La capside protéique des phages est ensuite dénaturée par chauffage, libérant l'ADN phagique. Cette suspension sert de matrice pour réaliser une PCR quantitative avec les amorces spécifiques des variants des gènes stx_2 décrites ci-dessous. La quantification étant faite de manière absolue, les résultats sont donnés en nombre de copies du gène stx_2 présentes dans le surnageant de culture.

3-2.2. Choix des amorces

Pour dessiner des amorces de PCR quantitative qui nous permettent de différencier les gènes des variants *stx₂*, *stx_{2-vha}*, *stx_{2-vhb}*, et *stx_{2c}*, nous avons réalisé un alignement nucléotidique des gènes des sous-unités A et B afin d'identifier les régions de divergence. Les amorces choisies doivent permettre l'amplification d'un brin d'ADN dont la longueur est comprise entre 100 et 200 pb. Le peu de divergence observée dans le gène de la sous-unité A nous a conduit à cibler une zone du gène de la sous-unité B comprise entre les nucléotides 100 et 130 pour l'amorce sens et la zone à l'extrémité 3' du gène pour l'amorce antisens (figure 31). Nous n'avons pas cherché à discriminer les variants *stx_{2-vha}* et *stx_{2c}* car aucune des souches de notre étude ne possède ces 2 variants. Finalement, 4 amorces sens différentes ont été obtenues : stx2F-1, stx2a, stx2b et stx2a-1 (tableau 8). L'amorce stx2a-1 dessinée dans la zone la plus divergente entre *stx_{2-vha}* et *stx_{2-vhb}* a été testée sur l'ADN de 2 souches possédant soit *stx_{2-vha}* seul, soit *stx_{2-vhb}* seul, et il s'est malheureusement avéré que cette amorce n'était pas capable de différencier ces 2 variants quelles que soient les conditions de PCR utilisées. Par conséquent, il nous a été impossible de quantifier de façon différentielle les gènes *stx_{2-vha}* et *stx_{2-vhb}*. La séquence de la sous-unité B des variants *stx_{2c}* et *stx_{2-vha}* étant identique, les zones de divergence entre *stx_{2c}* et *stx_{2-vhb}* sont également limitées, et par conséquent nous n'avons pas pu non plus discriminer les variants *stx_{2c}* et *stx_{2-vhb}*. En revanche, nous avons pu mettre au point des conditions de PCR permettant de différencier le gène *stx₂* du gène *stx_{2-vhb}*.

3-2.3. Génération des courbes standard

Nous avons choisi de quantifier les gènes de manière absolue, et pour cela il a fallu créer des standards pour chaque variant *stx₂*. Dans ce but nous avons amplifié à partir de l'ADN génomique des souches possédant un seul variant, un fragment de 800-900 pb qui après purification et quantification a été dilué afin d'obtenir une gamme de concentration d'ADN allant de 10⁹ à 1 copies pour 2 µl. Ces différentes gammes ont ensuite servi de matrice pour une PCR quantitative avec les amorces spécifiques des variants correspondants afin d'obtenir des droites standard qui permettent de quantifier de manière absolue les ADNc *stx₂* présents dans les échantillons. Nous avons ainsi obtenu 4 droites standard *stx₂* correspondant aux différents variants (*stx₂*, *stx_{2-vha}*, *stx_{2-vhb}*, *stx_{2c}*). Ces droites standard sont stockées par le logiciel LightCycler™ DataAnalysis et sont utilisées pour la quantification des échantillons.

3-2.4. Résultats

Les copies des variants du gène *stx₂* sont quantifiées dans les lysats de phages présents dans le surnageant de culture des souches 3 h après l'ajout de la MC (figure 36).

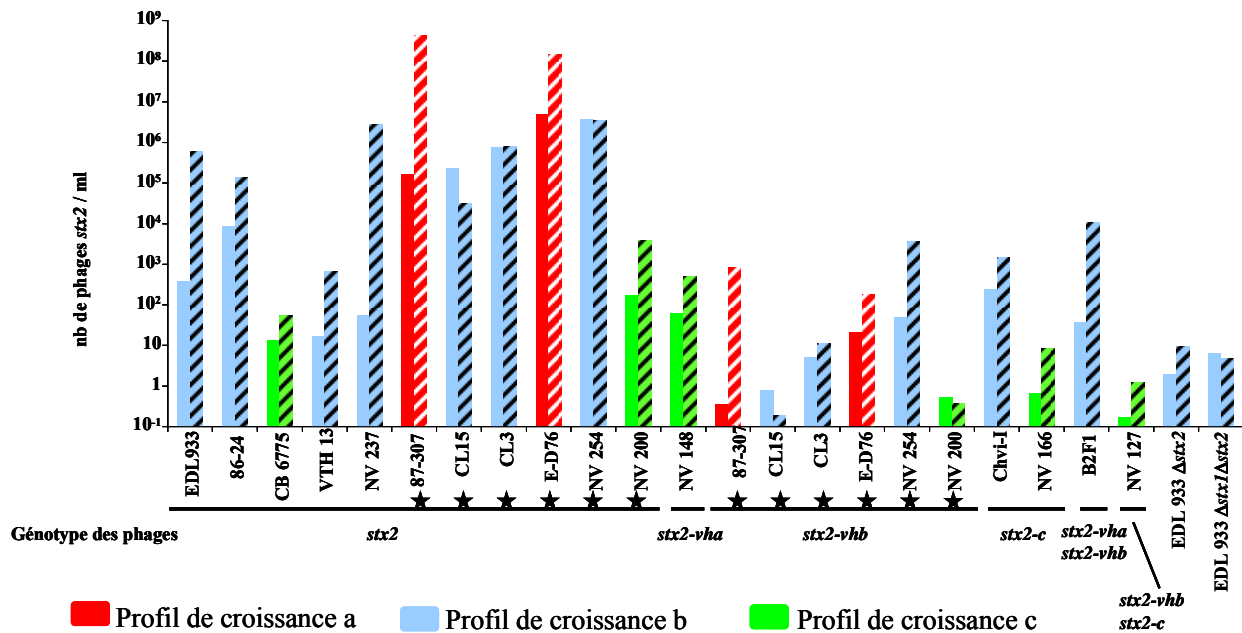


Figure 36 : Concentration des particules phagiques *stx2* dans les surnageants de cultures à 3 h.

La couleur des barres indique le profil de croissance de la souche correspondante. Les barres hachurées représentent les valeurs obtenues en présence de mitomycine C. Le génotype des particules phagiques est indiqué en-dessous du graphique.

★ Les souches portant à la fois les 2 variants *stx2* et *stx2-vhb* ont été testées séparément pour chacun des 2 variants.

Les deux souches présentant le profil de croissance a (lyse précoce) et possédant les variants *stx2* et *stx2-vhb* (ED 76, 87-307) sont celles qui produisent le plus de phages *stx2* en présence de MC, à 3h aussi bien qu'à 6 h (10^8 copies/ml). En revanche, peu de copies du gène *stx2-vhb* sont détectées dans les particules phagiques (10^2 à 10^3 /ml).

En ce qui concerne les souches présentant le profil de croissance b, trois cas de figure apparaissent. Dans le premier cas (EDL 933, 86-24, NV237), la concentration en phages *stx* est, comme attendu, plus élevée en présence de MC qu'en son absence, comme en témoignent les taux d'induction variant de 20 à 50000. Dans le deuxième cas (CL3, CL15, NV254), la quantité de phages *stx2* est élevée et identique (10^5 /ml) en absence et en présence de MC. Ces trois souches possèdent les variants *stx2* et *stx2-vhb*. Comme précédemment, les phages *stx2-vhb* sont beaucoup moins produits que les phages *stx2*. Dans le troisième cas (VTH 13, NV308, CHVi-I, B2F1), la production de phages *stx* est faible, mais plus élevée en présence de MC qu'en son absence, et une lyse est néanmoins observée. Il est à noter que ces quatre souches possèdent chacune un variant *stx* différent : *stx2* pour VTH 13, *stx2-vhb* pour NV308, *stx2c* pour CHVi-I, et *stx2-vha* + *stx2-vhb* pour B2F1.

Pour les souches présentant le profil de croissance c (pas de lyse en présence de MC), l'ADN des phages *stx* n'est pas détecté ou est présent en faible quantité en absence et en

présence de MC. Il faut cependant noter que les souches DEC16A, NV200, et NV148, qui ne lysent pas en présence de MC, produisent les mêmes quantités de phages *stx* que les souches VTH 13, NV308, CHVi-I qui, elles, lysent en présence de MC.

Pour un certain nombre de souches, représentatives des trois profils de croissance et des différents profils de production de phages *stx*, nous avons également quantifié les copies des variants *stx2* 6 h après l'ajout de la MC. Les quantités d'ADN phagiques sont en moyenne 2 à 5 fois plus élevées qu'à 3 h, mais les niveaux relatifs de chaque variant restent identiques.

4 - ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES VARIANTS *STX2*

L'analyse de la croissance des différentes souches ainsi que l'étude de la production de phages ont révélé que les souches ne sont pas également sensibles à la MC et ne produisent pas les mêmes quantités de phages *stx2*. Nous avons donc voulu étudier plus en détail la production de toxine, et en particulier la synthèse des ARNm *stx2*, en absence ou en présence de MC, par la technique de RT-PCR en temps réel. Pour cela, nous avons utilisé les mêmes amorces que celles utilisées pour la quantification de l'ADN *stx2* phagique, et il ne nous est donc pas possible de différencier les variants *stx2-vha* et *stx2c* du variant *stx2-vhb*. Afin de normaliser les concentrations d'ARNm *stx2*, nous avons choisi d'utiliser comme gène de ménage le gène *tufA*, dont l'expression varie très peu quelles que soient les conditions de culture des bactéries. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 8. Une courbe étalon a été obtenue pour ce gène de la même manière que décrite précédemment pour les gènes *stx2*.

Nous avons quantifié l'expression des gènes *stx2* par les STEC en phase exponentielle tardive de croissance, en absence et en présence de MC (figure 37). En absence d'induction du système SOS par la MC, seuls les ARNm des variants *stx2* et *stx2c* sont détectables. En effet, le niveau d'expression du variant *stx2* est significativement plus élevé que celui des autres variants ($P < 0,001$), mis à part celui du variant *stx2c* dans les souches CHVi-I et NV95 qui sont les seules souches O157:H7 qui expriment ce variant. Parmi les 6 souches possédant uniquement le variant *stx2*, deux ne présentent pas de niveau d'expression élevé, et il est intéressant de noter que ces 2 souches (CB 6775 et VTH13) sont les 2 seules qui ne sont pas de sérotype O157:H7. Dans le cas des souches possédant à la fois les variants *stx2* et *stx2-vhb*, la transcription du variant *stx2* est toujours plus élevée que celle du variant *stx2-vhb*. Nous n'avons malheureusement pas pu analyser l'expression différentielle des variants *stx2* dans les souches possédant à la fois *stx2-vha* et *stx2-vhb*, ou *stx2c* et *stx2-vhb*, ce qui nous aurait peut-être permis de

montrer que dans ces souches-là aussi le variant *stx_{2-vhb}* était peu exprimé. Les études statistiques réalisées par test ANOVA ne mettent pas en évidence de différence significative d'expression basale de *stx₂* en fonction de l'origine des souches (humaine ou bovine), du sérotype ou du séropathotype.

L'induction de l'expression de *stx₂* par la MC est très hétérogène. Globalement, la quantité d'ARNm *stx₂* est plus importante dans les souches de sérotype O157:H7 et de séropathotype A que dans les autres ($P < 0,01$ et $P < 0,001$ respectivement). De même, les souches de séropathotype A sont plus fortement induites que les souches de séropathotype C ($P < 0,01$). Globalement, les niveaux d'expression du variant *stx₂* sont plus élevés que ceux des autres variants, excepté celui du variant *stx_{2c}* présent dans les souches de sérotype O157:H7 (CHVi-I et NV95). La transcription de *stx₂* est induite de 25 à 100 fois dans toutes les souches exprimant *stx₂* seulement, mais quand il est associé à *stx_{2-vhb}* l'expression de *stx₂* n'est inductible que dans 2 souches sur 6. Dans les 4 autres souches, l'expression de *stx₂* est élevée, mais équivalente à celle observée en condition non induite. L'expression de certains variants *stx₂* est très faible et ne semble pas inductible par la MC : les ARNm *stx_{2-vhb}* ne sont pas ou très peu produits dans toutes les souches qui possèdent ce variant seul ou en association avec *stx₂*. Dans les 2 souches possédant la combinaison *stx_{2-vha}* + *stx_{2-vhb}* (B2F1, 87-2927), et les deux souches possédant la combinaison *stx_{2c}* + *stx_{2-vhb}* (NV127, NV199), on observe une induction bien que les taux d'ARNm restent très faibles ; néanmoins il n'est pas possible de savoir lequel des deux variants est exprimé.

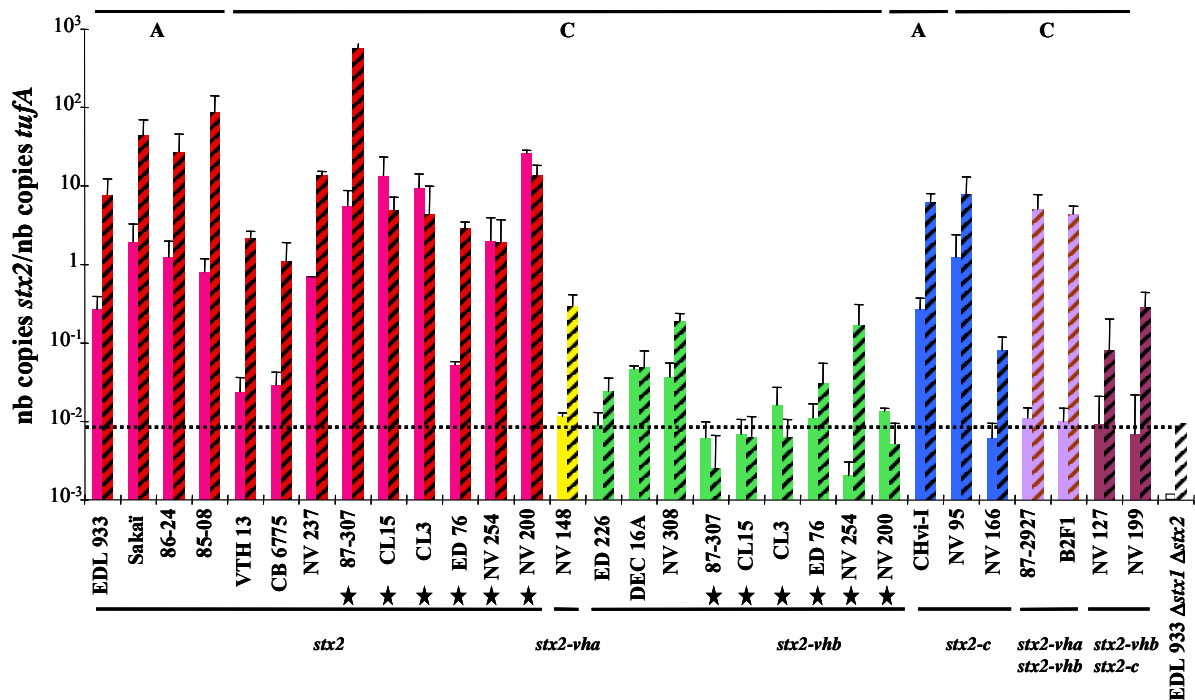


Figure 37 : Quantification relative des ARNm *stx2*.

Quantité relative d'ARNm *stx2* en absence de mitomycine C (barres pleines), et en présence de mitomycine C (barres hachurées). Les valeurs données sont les moyennes d'au moins trois expérimentations indépendantes. La ligne horizontale pointillée indique la valeur du contrôle négatif. ★ Les souches portant à la fois les 2 variants *stx2* et *stx2-vhb* ont été testées séparément pour chacun des 2 variants

Les courbes de croissance décrites ci-dessus montrent que l'induction de la phase lytique du phage est très précoce pour 3 souches possédant la combinaison *stx2* + *stx2-vhb* (87-307 87-2927 et ED 76, profil a). Par conséquent, nous avons étudié la synthèse d'ARNm à un temps plus précoce pour deux d'entre elles afin de nous assurer que la quantité d'ARNm messagers que nous observions à 3 h dans une faible population bactérienne était bien représentative de celle présente dans une population plus importante. Nous avons donc extrait les ARNm 90 minutes après ajout de la MC. De la même façon qu'à 3 h, aucun ARNm *stx2-vhb* n'était détectable à ce temps, alors que les messagers *stx2* étaient produits en aussi grande quantité qu'à 3 h. L'expression des variants *stx2-vha* et *stx2c* est induite de 10 à 30 fois, et elle n'atteint des niveaux relativement élevés que dans les souches de sérotype O157:H7.

En étudiant simultanément les croissances bactériennes et l'expression des gènes *stx2*, nous avons pu constater que la lyse induite par la MC était associée à une plus forte expression d'au moins un des 2 variants *stx2* présents. Dans les cas où la MC ne provoque pas de lyse, peu ou pas d'expression de ces gènes n'est observée.

En résumé, les allèles *stx2-vhb* sont les moins exprimés, aussi bien en conditions basales qu'en conditions induites, et ceci plus particulièrement dans les souches possédant à la fois les

variants *stx₂* et *stx_{2-vhb}*. Les taux d'induction sont significativement plus élevés pour les souches de sérotype O157:H7, et enfin les quantités d'ARNm *stx₂* sont plus élevées dans les souches appartenant aux sérotypotypes A et C et exprimant le variant *stx₂* que dans les autres souches du sérotypotype C.

5 - CORRELATION ENTRE L'EXPRESSION DES GENES *STX2* ET LA PRODUCTION DE PHAGES *STX2*

A 3 h une quantité significative d'ADN phagique n'est observée que dans les surnageants des souches qui présentent une forte transcription de *stx₂*. Une augmentation de la quantité de phages présents est observée lors du traitement à la MC excepté pour les souches dont la transcription n'est pas inductible (CL-15, CL-3, NV254). Après induction à la MC, l'ADN du phage *stx_{2-vhb}* n'est détecté en faible quantité que dans les 3 souches pour lesquelles nous avons observé une faible transcription du gène *stx_{2-vhb}* (NV308, DEC16A, NV254). Cependant et contrairement à nos attentes, nous avons aussi observé en présence de MC une augmentation de la quantité de phages portant *stx_{2-vhb}* pour la souche 87-307, alors que l'ARNm n'est pas détectable. Le cas de figure où il y aurait une forte synthèse d'ARNm mais une absence de particules phagiques n'a jamais été observé. La corrélation observée entre la croissance bactérienne, la quantité d'ARNm, et la production de phages indique que les variants *stx₂* qui sont portés par des prophages capables de produire des particules phagiques sont les seuls qui sont exprimés. Le promoteur du variant *stx_{2-vhb}*, quand il n'est pas porté par un prophage inductible, n'est pas actif dans nos conditions de culture (souches CL-3, CL-15 et NV200). Dans le cas des souches pour lesquelles l'expression de *stx₂* est forte mais non inductible par la MC, la quantité de phages *stx* est la même, que ce soit en absence ou en présence de MC (souches CL-3 CL-25 et NV254). Il apparaît donc que ces prophages présentent un taux d'induction spontanée anormalement élevé.

En résumé, l'expression des ARNm des gènes *stx₂* est bien corrélée à la production de phages *stx₂*, à l'exception de quelques cas particuliers dont il serait intéressant d'approfondir l'étude, ce qui n'a pas pu se faire dans le cadre de ce travail. Bien que l'expression de ces gènes soit variable selon les souches, 3 principaux profils se sont dégagés :

- Gènes bien exprimés à l'état basal, dont l'expression est induite par la MC et atteint des taux élevés; ils sont portés par des prophages inductibles présentant un taux d'induction spontané faible à élevé; il s'agit essentiellement du variant *stx₂* ; les souches présentent le profil de croissance b.

- Gènes dont l'expression est aussi élevée en absence et en présence de MC ; ils sont portés par des phages non inductibles par la MC, mais leur taux d'induction spontané est élevé. Il s'agit du variant *stx₂*, mais présent dans des souches portant également le variant *stx_{2-vhb}* ; curieusement, les souches présentent également le profil de croissance b.
- Gènes pas ou très peu exprimés en absence et en présence de MC ; ils sont portés par des phages généralement non inductibles dont le taux d'induction spontané est très faible, ou par des prophages défectifs, ou ils ne sont pas portés par des prophages (pas de particules phagiques *stx₂* détectées, en absence et en présence de MC) ; il s'agit essentiellement du variant *stx_{2-vhb}* ; lorsque les souches ne possèdent que ce variant, elles présentent le profil de croissance c.

Le milieu LB est un milieu riche en nutriments et la question s'est posée de savoir si l'expression de *stx₂* et la production de phages *stx₂* sont affectées par une contrainte de disponibilité de nutriments. Pour cela nous avons étudié la synthèse d'ARNm *stx₂* et la production de phages *stx₂* dans un milieu DMEM contenant une faible quantité de glucose (1g/l). Nous n'avons pas pu malheureusement étudier chacune des souches utilisées pour l'étude en LB dans ces nouvelles conditions mais nous avons choisi 6 souches dont les profils d'expression de *stx₂* et de production de phages étaient caractéristiques des cas particuliers que nous venons de citer. Nous n'avons pas observé de différences entre les données obtenues en LB et les données obtenues en DMEM. Les 2 seuls variants *stx₂* exprimés en absence d'induction à la MC sont les variants *stx₂* et *stx_{2c}*. Les taux d'induction de l'expression de *stx₂* observés en DMEM sont les mêmes que ceux observés en LB. Les variants *stx_{2-vhb}* qui ne sont pas exprimés en LB ne le sont pas non plus en DMEM et, de la même façon qu'en LB, la production de phages *stx₂* est bien corrélée avec la synthèse d'ARNm.

6 - PRODUCTION DE STX2

Nous avons voulu confirmer que la toxine Stx2 était bien produite par les souches STEC de notre étude. Pour cela, nous avons dosé les quantités de Stx2 présente dans le surnageant de culture par la méthode ELISA. Cette technique ELISA est couramment utilisée lors de diagnostics sur échantillons animaux alimentaires ou même cliniques afin de tester la présence ou l'absence de toxine, ce qui est un bon indicateur de présence ou absence de STEC.

Des kits de dosage de toxine Stx existent dans le commerce, tels que Premier EHEC (Meridian Diagnostics Inc.). Ceux-ci ne permettent pas de quantifier la toxine, mais

seulement d'évaluer son absence/présence. De plus, ils ne permettent pas de distinguer Stx1 de Stx2. Il nous a donc fallu au laboratoire développer un outil fiable pour doser les Shiga-toxines et la Shiga-toxine Stx2 en particulier. C'est pourquoi nous avons mis au point un test ELISA « sandwich » dont le détail est présenté dans la section Matériel et Méthodes, et qui s'est avéré particulièrement simple et efficace pour quantifier la toxine Stx2 présente dans nos surnageants de culture. Cependant, une limite importante a vite été identifiée. Dans le cadre de notre étude, il aurait été intéressant de pouvoir discriminer 2 variants Stx2 différents dans le même surnageant. Malheureusement, les différents variants Stx2 ne sont pas immunologiquement distincts, et il n'est donc pas possible d'obtenir des anticorps capables de les différencier.

L'étude de la production de toxine Stx2 dans le surnageant a révélé qu'en conditions non induites les bactéries produisent 30 à 800 ng/ml de Stx2 au bout de 3 h de culture (début de phase stationnaire) (figure 38). Globalement les souches d'origine humaine libèrent plus de Stx2 que les souches d'origine animale dans ces conditions ($P < 0,05$). Les souches de sérotypage A produisent d'avantage de Stx2 que les souches de appartenant au sérotypage C ($P < 0,01$). Ceci est probablement dû au fait que les souches appartenant au sérotype O157:H7 produisent significativement plus de Stx2 que les souches de sérotype O113:H21 ($P < 0,01$). En revanche, les souches de sérotype O91 ne sont pas significativement plus productrices de Stx2 que les souches O113:H21 et ne sont pas non plus moins productrices que les souches O157:H7. Du fait de la limite technique imposée à notre test par l'absence de spécificité immunologique des différents variants, il s'est avéré difficile d'étudier l'influence de ces variants sur la production de Stx2. En particulier, nous n'avons pas pu évaluer la part respective des variants Stx2 et Stx2-vhb dans les souches les possédant tous deux.

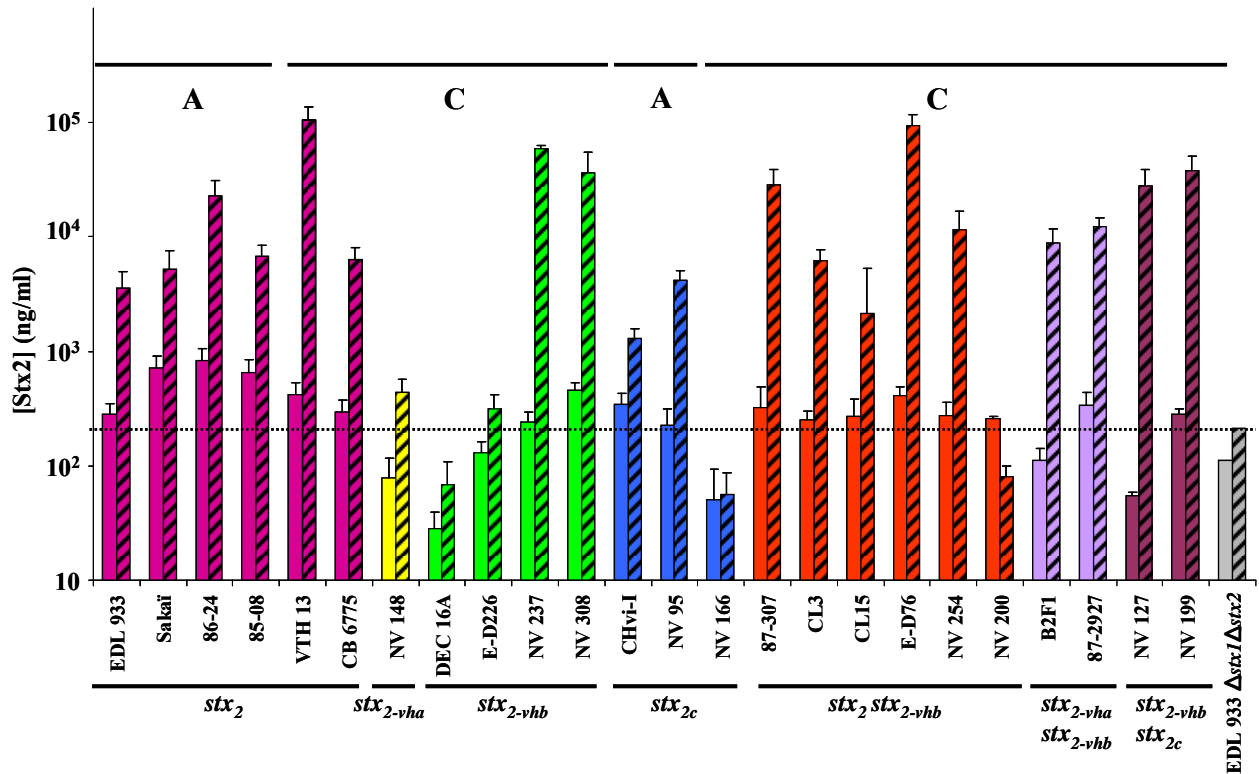


Figure 38 : Quantité de Stx2 présente dans le surnageant de culture des souches STEC.

Les barres pleines représentent la quantité de Stx2 produite en absence d'induction à la mitomycine C et les barres hachurées en présence de mitomycine C. Les valeurs sont la moyenne d'au moins trois expérimentations indépendantes. Le sérotypage des souches est indiqué en haut du graphique et le génotype *stx2* des souches est indiqué en bas. La ligne horizontale pointillée indique la valeur du contrôle négatif.

Sous l'influence de la MC la production de Stx2 est induite de 10 à 140 fois, atteignant des valeurs de 3000 à 100000 ng/ml dans la plupart des souches (18/23). Le traitement à la MC a pour effet d'effacer les différences entre les souches d'origine humaine et bovine d'une part et entre les souches de sérotypage A et C d'autre part. Cela peut s'expliquer par le fait que les souches de sérotypage C sont plus fortement induites que les souches de sérotypage A ($P < 0,05$), et par la plus forte induction de la production de Stx2 par les souches de sérotype O91:H21 comparativement aux souches O157:H7. De plus, les souches appartenant au sérotypage A ne portent qu'un seul variant *stx2*, alors que les souches de sérotypage C qui composent notre étude portent majoritairement 2 variants *stx2* (9/17). Or, nous avons observé que les souches possédant 2 variants *stx2* produisent plus de Stx2 que les souches ne possédant qu'un seul variant, mais uniquement sous l'action de la MC ($P < 0,05$). Elles sont également plus fortement induites que les souches ne possédant qu'un variant ($P < 0,01$).

Un phénomène très étonnant a été observé pour les 3 souches CL-3, CL-15, et NV254. Ces souches ne montrent aucune induction de la synthèse d'ARNm ou de la production de phages *stx2* sous l'effet de la MC, mais la production de Stx2 est induite. Ce résultat s'est avéré tout à

fait reproductible. Pour toutes les autres souches, la présence ou l'absence d'induction au niveau transcriptionnel ou de la production de phages corrèle très bien avec la production de Stx2 dans le milieu.

DISCUSSION

Il a été émis l'hypothèse que la capacité des STEC à causer des maladies plus ou moins sévères était liée au type et à la quantité de Shiga-toxine libérée (Paton *et al.*, 1995). Cependant, l'expression des variants *stx2* présents chez les souches STEC appartenant à différents séropathotypes n'a jusqu'à présent pas été vraiment étudiée.

Dans notre étude, nous avons déterminé la nature du ou des variants *stx2* portés par un panel de 49 souches STEC isolées de cas cliniques ou de bovins sains. Parmi ces souches 10 appartiennent au séropathotype A qui regroupe les souches de sérotype O157:H7 possédant le LEE, et qui sont les plus fréquemment associées aux épidémies de grande ampleur de par le monde (Karmali *et al.*, 2003). 32 souches appartiennent au séropathotype C qui inclut principalement des souches non-O157, LEE négatives et fréquemment associées à des cas sporadiques de SHU (Karmali *et al.*, 2003). Les 7 dernières souches appartiennent au séropathotype E qui regroupe les STEC de divers sérotypes qui n'ont jamais été isolées de cas cliniques et qui sont donc considérées comme non pathogènes pour l'Homme. La cytotoxicité de ces 49 souches a été étudiée sur le modèle des cellules Vero. Puis un échantillon de 24 souches représentatives du groupe d'origine concernant les critères origine, variant *stx2* et sérotype, a été constitué afin d'étudier l'induction par la MC de l'expression des variants *stx2*, la libération de toxine et la production de particules phagiques.

La cytotoxicité des différentes souches STEC évaluée par la libération de la LDH par les cellules Vero s'est révélée élevée et similaire pour la plupart des souches. La plus faible cytotoxicité des souches NV166, NV171 et NV270 portant le variant *stx2c* pourrait être liée à la faible production de toxine dans le milieu tandis que la faible cytotoxicité de la souche NV148 *stx2-vha* semble être due aussi à la faible toxicité de la toxine en elle-même. Lingren *et al.* ainsi que Paton *et al.* ont montré que la substitution d'un seul acide aminé en position 16 de la sous-unité B mature (Asp par Asn) de Stx2-vhb (Lindgren *et al.*, 1994) et de 2 autres toxines, Stx2-OX3a et Stx2-O48 (Paton *et al.*, 1995b), réduisait la cytotoxicité envers les cellules Vero (voir alignements de séquences en annexe VI). Cependant, lors de nos investigations nous n'avons observé aucune différence significative de toxicité entre Stx2 et Stx2-vhb. Cette apparente contradiction pourrait être expliquée par les différentes procédures expérimentales utilisées. En effet, Lingren *et al.* ont utilisé de la toxine purifiée et Paton *et al.* ont utilisé des lysats bruts d'*E. coli* K12 exprimant des toxines recombinantes. De notre côté

nous avons utilisé des surnageants de culture de souches STEC sauvages. De plus, les auteurs cités ont mesuré la cytotoxicité après 2 ou 3 jours d'incubation alors que nous l'avons fait après seulement 24 heures. Quoiqu'il en soit, la substitution d'un acide aminé en position 16 de la sous-unité B mature de Stx2-vhb est aussi retrouvée dans le cas de Stx2-vha et Stx2c (Figure 31). Par conséquent cette cytotoxicité inférieure observée pour le variant Stx2-vha pourrait être expliquée par une substitution supplémentaire en position 19 de la sous-unité A mature. En effet, le résidu sérine trouvée chez Stx2, Stx2c et Stx2-vhb est remplacé par un résidu thréonine dans le variant Stx2-vha. Cette hypothèse peut être confortée par le fait que Paton a montré que la substitution d'un seul acide aminé dans la sous-unité A est responsable de la plus faible toxicité de Stx2-O111 (Paton *et al.*, 1995). Les souches du sérotypage E présentent aussi une forte cytotoxicité alors qu'elles ne sont jamais isolées de cas cliniques. La non pathogénicité de ces souches ne peut donc pas être expliquée par le fait que le variant qu'elles possèdent (Stx2-NV206) est moins cytotoxique, mais peut-être par l'absence d'autres facteurs de virulence impliqués dans la colonisation par exemple, ou dans les processus inflammatoires générés par les STEC. Ces souches sont cependant peu étudiées et il est par conséquent difficile de tirer des conclusions définitives à leur sujet.

Les résultats de cytotoxicité obtenus par la mesure de la quantité de LDH libérée par les cellules en nécrose mettent en lumière le manque de sensibilité et par conséquent le manque de pertinence de l'utilisation de ce genre de test quand il s'agit de discriminer des souches virulentes de souches avirulentes. En effet, une faible quantité de toxine suffit à induire la mort cellulaire d'un grand nombre de cellules et par conséquent il est difficile d'observer des différences de cytotoxicité entre des souches qui produisent des quantités variables de toxine. Les plus grandes différences qui pourront être observées seront inhérentes à la toxicité absolue d'un type de toxine par rapport à un autre à une même concentration.

Plusieurs auteurs ont démontré que les prophages codant Stx2 sont très variables (Johansen *et al.*, 2001; Ritchie *et al.*, 2003) et présentent une forte hétérogénéité en termes de taux d'induction (Muniesa *et al.*, 2004b; Wagner *et al.*, 1999). En accord avec ces observations, nous avons vu que l'expression des gènes *stx2* est hétérogène aussi bien en conditions basales qu'en conditions induites en fonction de la souche étudiée et du variant *stx2*. L'analyse en PCR quantitative des différents gènes *stx2* a montré que les quantités d'ARNm *stx2* étaient plus importantes que celles des variants *stx2-vha* et *stx2-vhb*. Une analyse plus détaillée a montré une expression hétérogène d'un variant *stx2* donnée corrélée à une quantité de phage libérée hétérogène en fonction de la souche. Par exemple, deux souches exprimant *stx2c* (CHvi-I et NV95) produisent de grandes quantités d'ARNm *stx2c* et de phages, ce qui n'est pas observé

dans une troisième souche, NV166. Parmi les 9 souches possédant le variant *stx_{2-vhb}* seul ou en association avec *stx₂*, seules 3 souches présentent une quantité d'ARNm *stx_{2-vhb}* détectable bien que très faible. Dans le cas des souches produisant Stx2, de grandes différences de quantité d'ARNm ont été observées aussi bien en conditions basales qu'induites. Les gènes *stx2* fortement exprimés en absence de MC sont probablement portés par des prophages présentant un fort taux d'induction spontané, conduisant à une forte production de particules phagiques et à une forte libération de toxine indépendamment du système SOS. Des études antérieures indiquent que le prophage 933W codant la toxine Stx2 dans la souche EDL 933 est plus facilement induit que les autres phages de type Lambda qui ne codent pas Stx (Livny and Friedman, 2004). Notre étude permet d'étendre cette observation à un grand nombre de souches appartenant à d'autres sérotypes, ce qui tend à prouver que les phages portant le variant *stx₂* présentent un niveau élevé d'induction spontané tandis que les variants *stx_{2-vha}*, *stx_{2-vhb}* et la plupart des variants *stx_{2c}* ne sont pas ou peu induits en absence d'induction par la MC.

Après traitement à la MC, la transcription des variants *stx₂*, *stx_{2-vha}* et *stx_{2c}* est induite, mais celle de *stx_{2-vhb}* n'est induite que dans 2 souches sur 9. Cette expression différentielle a aussi été observée dans les souches possédant les 2 variants *stx₂* et *stx_{2-vhb}* dans lesquelles nous avons mesuré de fortes quantités d'ARNm *stx₂* et de faibles quantités d'ARNm *stx_{2-vhb}* aussi bien en conditions normales de culture qu'en conditions induites. Ceci indique que dans la plupart des cas, l'expression de *stx_{2-vhb}* n'est pas induite après traitement à la MC et par conséquent suggère que pour les souches concernées, le gène *stx_{2-vhb}* est présent sur un phage défectif ou bien n'est pas porté par un phage. Cette idée est appuyée par le fait que l'on ne retrouve pas de particules phagiques *stx_{2-vhb}* dans le surnageant. Une autre possibilité dans le cas de souches portant à la fois les variants *stx₂* et *stx_{2-vhb}* est que les phages *stx_{2-vhb}* seraient induits plus tard que les phages *stx₂*, si bien que l'induction de ces derniers pourrait provoquer la lyse bactérienne avant que les ARNm *stx_{2-vhb}* ne soient produits. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous avons détecté de faibles quantités d'ARNm *stx_{2-vhb}* dans le cas de la souche 87-307 après induction par la MC. Quoi qu'il en soit, d'autres études ont déjà montré que certains gènes *stx2* n'étaient pas associés à des prophages inductibles (Teel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), et que dans les souches possédant 2 variants *stx2*, seul un d'entre eux était inductible (Teel *et al.*, 2002; Muniesa *et al.*, 2003). En particulier, en utilisant 2 mutants isogéniques de la souche B2F1 produisant soit *stx_{2-vha}* soit *stx_{2-vhb}*, Teel *et al.* ont montré que l'expression de *stx_{2-vha}* était inductible mais que celle de *stx_{2-vhb}* ne l'était pas (Teel *et al.*, 2002). Dans une étude portant sur 168 souches STEC, Muniesa *et al.* ont trouvé que 5

souches possédaient 2 copies de *stx2*. Dans tous les cas, seulement une copie était associée à un prophage inducible (Muniesa *et al.*, 2004b). Un promoteur constitutif peu ou pas du tout actif contrôlant l'expression des gènes *stx2* dans les souches O157 a été décrit (Sung *et al.*, 1990; Plunkett *et al.*, 1999). La très faible quantité d'ARNm *stx2-vhb* détectée en conditions basales ou induites pourrait indiquer que ce gène est exprimé à partir d'un promoteur peu actif de ce type dans les conditions utilisées.

En résumé, nos résultats suggèrent que les gènes *stx2* sont exprimés seulement s'ils sont portés par un prophage sujet à une induction spontanée élevée ou bien à une induction médiée par le système SOS. En particulier, les gènes *stx2-vhb* ne sont pas ou très peu exprimés en conditions basales ou induites et dans la plupart des cas ces gènes ne sont pas retrouvés dans les génomes des phages présents dans le surnageant de culture. Les taux d'induction et les quantités d'ARNm *stx2* sont significativement plus élevés dans le cas des souches O157:H7 que dans le cas des autres sérotypes ($P < 0,01$). De plus, les quantités d'ARNm *stx2* des souches de sérotypage A et des souches de sérotypage C possédant le variant *stx2* sont plus élevées que celles des autres souches du sérotypage C.

Nous avons trouvé que les quantités de toxine Stx2 libérée par les souches STEC dans le surnageant de culture en milieu LB est variable. Ceci est probablement dû à une induction spontanée du phage puisque la toxine n'est détectée que dans le cas où des particules phagiques sont détectées. Cette production de toxine en conditions basales est donc variable en fonction des souches étudiées mais est significativement plus élevée chez les souches d'origine humaine que chez les souches d'origine bovine. Nous avons aussi observé des différences dans l'effet de la MC sur la production de toxine Stx2 par les différentes souches. Contrairement aux observations de Ritchie *et al.* (Ritchie *et al.*, 2003), nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les souches d'origine humaine et les souches d'origine bovine en ce qui concerne la quantité de toxine libérée ou le taux d'induction. Ce désaccord provient probablement du choix des souches. En effet, toutes les souches d'origine humaine à l'exception d'une seule provenaient du sérotypage A (le plus virulent) dans l'étude de Ritchie tandis que la moitié des souches d'origine humaine de notre étude provient du sérotypage C.

Certaines souches présentent des comportements particuliers. Par exemple, la courbe de croissance de la souche NV200 ne présente pas de lyse en présence de MC alors que l'expression du variant *stx2* est très forte et non inducible. De plus, le surnageant de culture de cette souche contient une quantité de phages *stx2* relativement importante mais ne fait pas

état d'une grande quantité de toxine Stx2. La faible production de Stx2 alors qu'il y a une accumulation importante de messagers *stx₂* pourrait s'expliquer par une faible efficacité de la traduction. En revanche il est difficile d'expliquer l'absence de lyse bactérienne alors qu'il y a une production de phage suffisante pour induire la lyse chez la souche VTH13 par exemple.

La souche NV127 soulève aussi quelques interrogations. En effet, cette souche présente une quantité d'ARNm *stx_{2c}* faible ainsi qu'une faible production de phages. Ceci est en accord avec son profil de croissance, c'est-à-dire que cette souche ne lyse pratiquement pas sous l'effet de la MC. En revanche, c'est en contradiction avec la grande quantité de toxine Stx2 mesurée dans le surnageant, qui est une des plus fortes observées lors de notre étude. Le profil de cette souche est identique à celui de la souche NV199 à l'exception toutefois du fait que la souche NV199 montre une forte lyse en présence de MC. Dans le cas de cette souche, le manque de corrélation entre le taux de transcription des gènes *stx₂* et la quantité de toxine Stx2 effectivement produite pourrait être expliquée par une très bonne efficacité de la traduction.

Les 2 souches CL3 et CL15 présentent aussi une singularité. En effet, ces 2 souches produisent de fortes quantités d'ARNm *stx₂* de façon non inductible, et produisent ainsi une aussi grande quantité de phages *stx₂* en conditions basales qu'en conditions induites. En revanche, elles ne sont lysées qu'en présence de MC (profil de croissance b), et elles produisent plus de Stx2 en présence de MC. On pourrait expliquer cette augmentation par une efficacité de traduction augmentée sous l'effet de la MC, mais l'absence de lyse en conditions basales alors que la quantité de phages produits est importante est plus difficilement explicable. La lyse observée en conditions induites alors que la quantité de phages *stx₂* est identique à celle produite en conditions basales pourrait être due à une induction de phages autres que ceux portant les gènes *stx₂*, et non encore caractérisés. Il est à noter que ces souches ne possèdent pas *stx₁*. De toute façon, il a été montré que les phages *stx₁* sont très peu inductibles par la MC (Ritchie *et al.*, 2003).

CONCLUSION

Les résultats présentés dans cette étude soulignent l'hétérogénéité génétique qu'il existe entre les souches STEC, qui se traduit entre autre par des modalités d'expression des Shiga toxines très variées, au niveau transcriptionnel mais aussi vraisemblablement au niveau traductionnel. Cela reflète certainement des différences de structure des phages porteurs des gènes *stx2*. Au regard de notre travail et des données de la littérature, il apparaît que la nature des variants *stx2* et les modalités de leur expression dépendent de la lignée phylogénétique des souches. Ainsi, par exemple, le variant *stx2* est principalement associé aux souches très virulentes d'origine humaine appartenant au séropathotype A (souches O157) alors que le variant *stx2-NV206* est associé au séropathotype E, non pathogène. Il existe clairement une relation entre le séropathotype, l'expression des variants *stx2*, la quantité de phages et la quantité de toxine libérée en conditions basales ou induites. Cependant, au sein du séropathotype C, une partie des souches LEE négatives montrent les mêmes caractéristiques que les souches du séropathotype A en ce qui concerne l'expression des gènes *stx2* et l'induction, et ainsi pourraient représenter un plus gros risque pour la santé humaine que les autres souches du même séropathotype.

CHAPITRE 2

REGULATION DE L'EXPRESSION DE *STX2* PAR LES POLYAMINES ET LE QUORUM SENSING

RESULTATS

Les données présentes dans la littérature laissent penser que certaines molécules produites par l'hôte et/ou le microbiote résident pourraient avoir une influence sur la production de toxine Stx2 par les EHEC. Parmi ces molécules figurent les polyamines qui sont produites à la fois par le microbiote et par les cellules épithéliales intestinales, et qui sont donc présentes en abondance dans le tube digestif. L'épinéphrine et la norépinéphrine sont aussi susceptibles d'être impliquées dans la régulation de l'expression de *stx2*. Ces 2 molécules sont présentes dans le tube digestif, en particulier la norépinéphrine qui est produite par les neurones adrénergiques afférents au tube digestif. De plus, elles sont capables d'agir comme des autoinducteurs du quorum sensing, et ainsi d'induire l'expression de facteurs de virulence des EHEC tels que le LEE et le flagelle. Enfin, bien que sujets à caution, certains résultats suggèrent que les systèmes de quorum sensing auxquels participent ces 2 hormones sont impliqués dans la production de Stx2. Dans ce chapitre, nous décrivons l'effet de ces différentes molécules sur la production de Stx2 par la souche EHEC O157:H7 de référence dont le génome est séquencé, EDL 933.

1 - EFFET DES POLYAMINES

Il a été montré que les polyamines étaient nécessaires à la bonne mise en place de la réponse SOS induite par la MC ou les UV chez *E. coli* K12 (Oh and Kim, 1999; Kim and Oh, 2000). Or, les polyamines sont présentes à des concentrations de l'ordre du mM dans le tube

digestif (Milovic and Turchanowa, 2003). Elles sont ingérées par l'alimentation (Romain *et al.*, 1992) et sont produites non seulement par l'hôte mais aussi par le microbiote résident (Thomas and Thomas, 2001; Noack *et al.*, 1998). En particulier, il a été montré que *Bacteroides thetaiotaomicron* produisait de grandes quantités de polyamines dans certaines conditions (Noack *et al.*, 2000). Nous avons donc recherché si l'induction de la production de Stx2 par la MC, due à la réponse SOS, était dépendante des polyamines. Pour cela, nous avons cultivé la souche EDL 933 dans un milieu minimum dépourvu de polyamines, auquel nous avons ajouté de la spermine aux concentrations généralement utilisées dans la littérature, 1 mM et 2.5 mM. Nous avons choisi la spermine car il a été montré que c'est la polyamine qui a le plus d'effet sur l'induction de la réponse SOS chez *E. coli* K12 (Oh and Kim, 1999). Nous n'avons observé aucun effet significatif de la spermine, ni sur le profil de croissance, ni sur la production de Stx2 en présence de MC (figure 39).

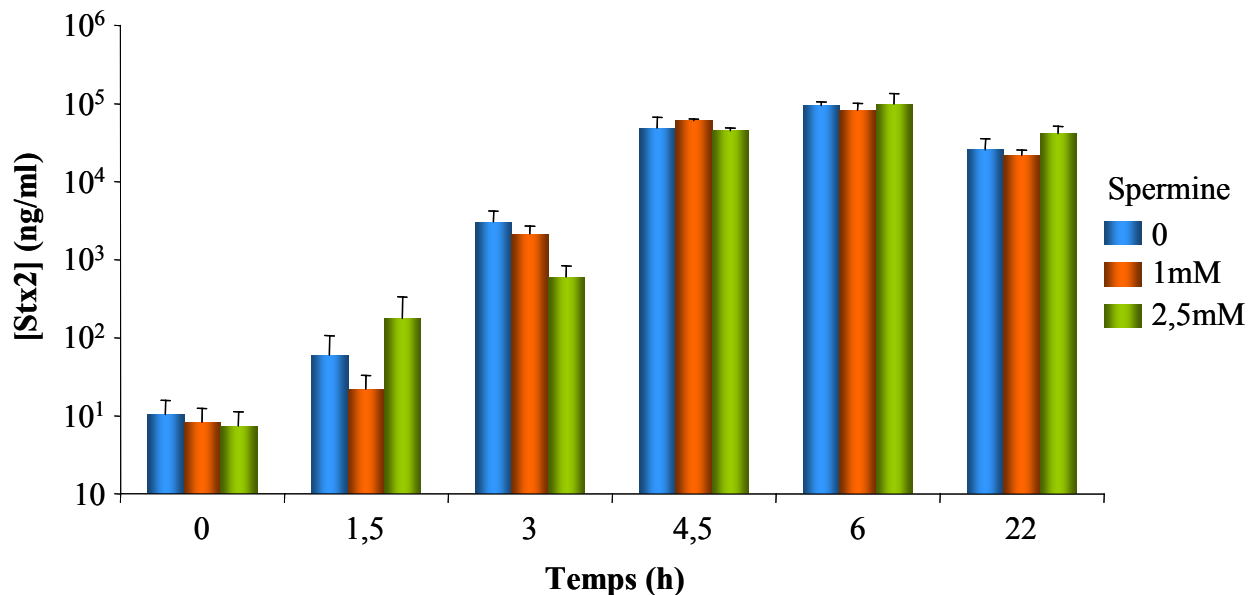


Figure 39 : Production de toxine Stx2 en milieu M9 en absence et en présence de spermine à différentes concentrations en présence de mitomycine C.

Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. Les SEM sont indiquées par les barres d'erreur.

Cependant, les *E. coli* sont capables de synthétiser des polyamines à partir d'ornithine et d'arginine. Cette synthèse *de novo* est peut-être suffisante à l'induction de la réponse SOS en présence de MC. Chez un mutant de *E. coli* K12 $\Delta speB\Delta speC$, déficient pour la synthèse des polyamines, le gène *recA* n'est plus induit sous l'effet de la MC; l'ajout de spermidine restaure l'induction de *recA* (Kim and Oh, 2000). Nous avons donc construit un mutant $\Delta speB\Delta speC$ chez EDL 933. La croissance de ce mutant est ralentie comparativement à la souche sauvage (figure 40) comme en témoignent les taux d'accroissement de $1,1 \text{ h}^{-1}$ pour la souche parentale

et $0,92 \text{ h}^{-1}$ pour le mutant lors de la première heure de culture (DO_{600} après 1 h : 0,84 vs 0,35). Mais après 4h de culture, les deux souches atteignent des densités bactériennes similaires (DO_{600} 1.9-2.1). Ce retard de croissance était attendu de la part d'un mutant déficient pour la synthèse de polyamines (Chattopadhyay *et al.*, 2003).

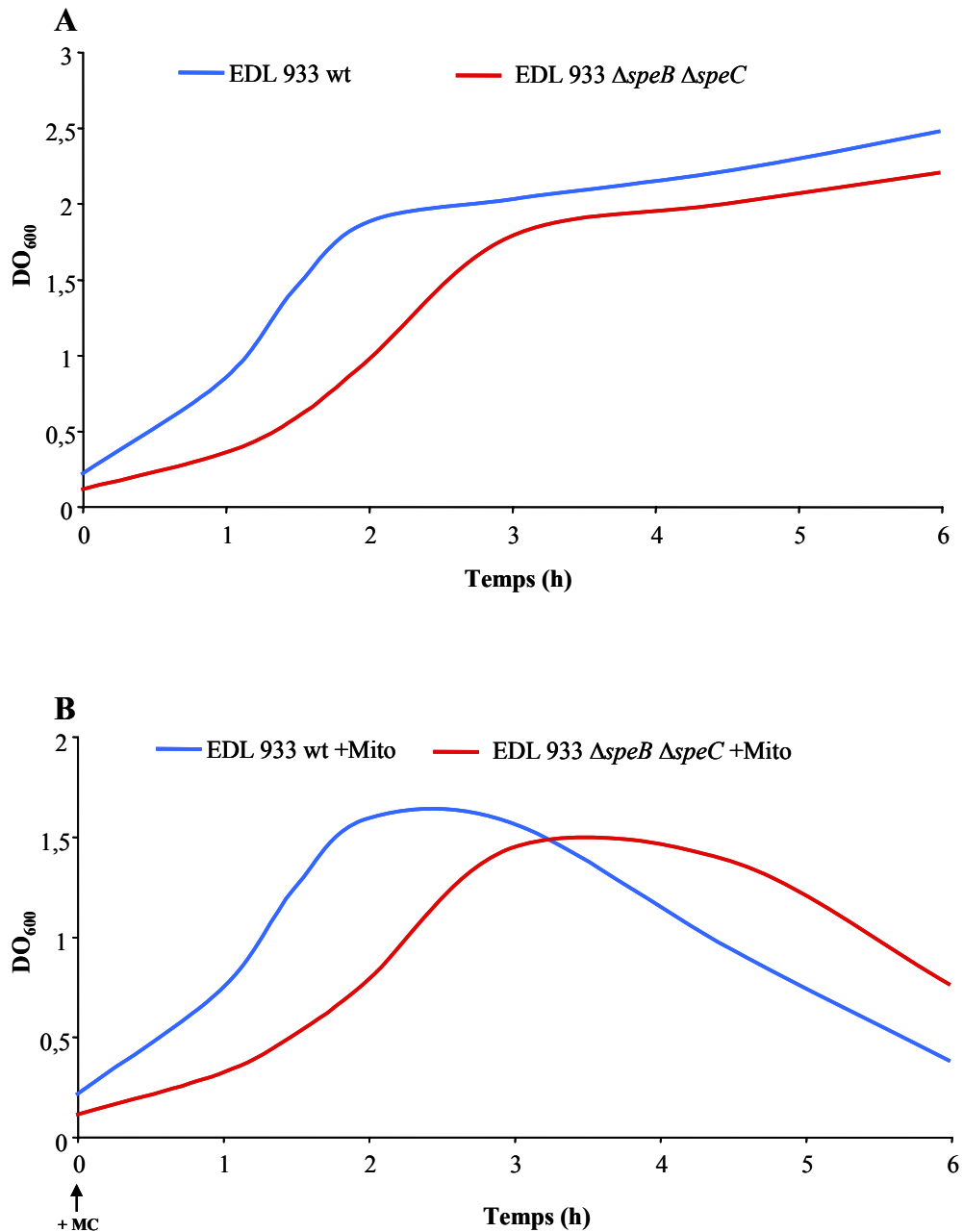


Figure 40 : Courbe de croissance de EDL 933 et du mutant EDL 933 $\Delta\text{speB}\Delta\text{speC}$ en milieu LB en absence (A) et en présence de 250 ng/ml de mitomycine C (B).

Mais ce mutant lyse et produit autant de Stx2 que la souche sauvage 1h30, 3h, et 6h après l'ajout de la MC (figure 41). Il ne semble donc pas que chez *E. coli* O157:H7 les polyamines aient une influence majeure sur la production de Stx2. Cependant, il serait intéressant de compléter ces observations par l'analyse de l'induction de *recA* et de la production de phages

stx2 dans le mutant $\Delta speB\Delta speC$. D'autre part, le dosage des polyamines endogènes est en cours afin de s'assurer que ce mutant est bien déficient pour la synthèse de polyamines, comme cela est décrit pour *E. coli* K12. En effet, la spermidine peut aussi être synthétisée à partir de S-adenosyl méthionine par le produit du gène *speE*, la spermidine synthase. Il serait donc peut-être nécessaire de refaire ces analyses dans un mutant $\Delta speB\Delta speC \Delta speE$.

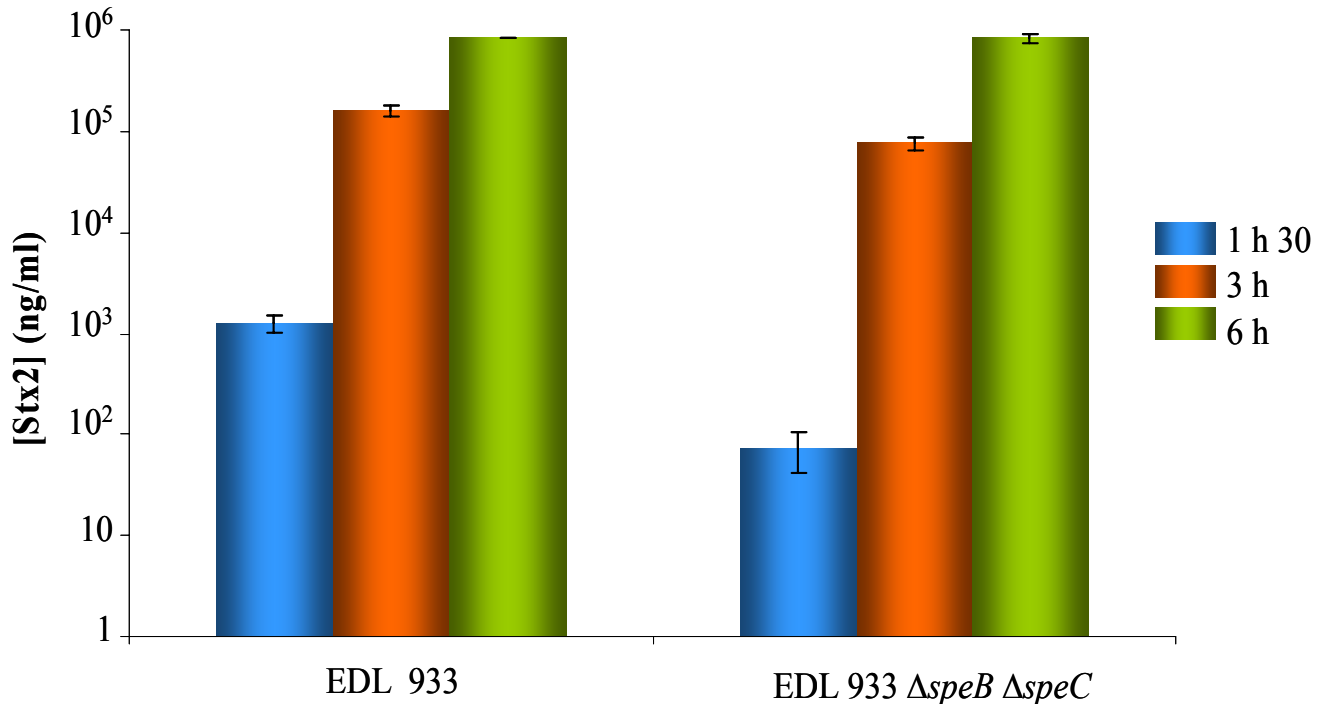


Figure 41 : Production de Stx2 par EDL 933 et le mutant EDL 933 $\Delta speB\Delta speC$ en DMEM en présence de mitomycine C.

Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

2 - IMPLICATION DU QUORUM SENSING

Nous avons cherché à savoir si oui ou non le quorum sensing influençait la production de toxine Stx2 par les EHEC. Pour cela, nous avons conditionné un milieu complet (LB) avec la souche EHEC EDL 933. Cette souche possède le gène *luxS* et est par conséquent théoriquement capable de produire les autoinducteurs AI-2 et AI-3. Nous avons tout d'abord vérifié que le milieu LB conditionné contenait bien l'AI-3 grâce à la souche reportrice TEVS232 (figure 42). Cette souche *E. coli* K12 porte une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron *LEE1*, dont l'activité est induite par AI-3/épinéphrine/norépinéphrine, et l'opéron *lacZYA*. L'activité β -galactosidase de la souche TEVS232 augmente de façon

significative ($P < 0,01$) d'un facteur 2,3 dans le milieu conditionné par EDL 933. Ceci indique que de l'AI-3 a bien été produit par la souche EDL 933.

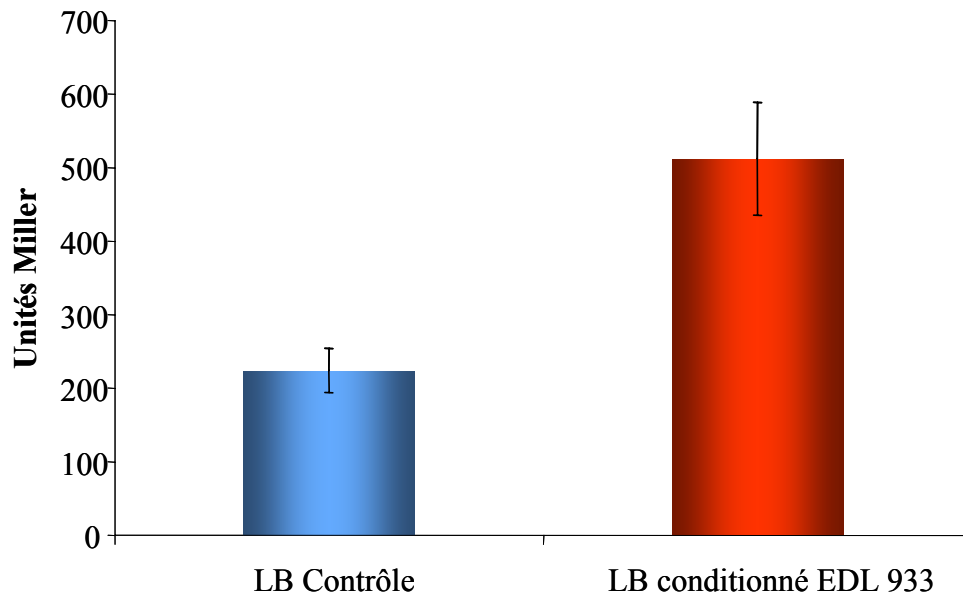


Figure 42 : Présence de l'auto-inducteur 3 dans le milieu LB conditionné par la souche EHEC EDL 933.

L'activité β -galactosidase de la souche reporter TEVS232 portant une fusion *LEE1-lacZYA* est représentative de la quantité d'AI-3 présente dans le milieu.

Pour des raisons techniques nous n'avons pas pu vérifier la production d'AI-2. Nous avonsensemencé le milieu LB conditionné avec la souche EHEC EDL 933 et nous avons mesuré la production de toxine Stx2 au cours du temps. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus dans le milieu LB non conditionné (figure 43). Nous n'avons pas observé de différence significative de la concentration de Stx2 dans le surnageant bien que la quantité de Stx2 dans le milieu conditionné soit légèrement supérieure. Cette différence est expliquée par le fait que le milieu conditionné par EDL 933 contient déjà la toxine Stx2 produite lors du conditionnement. Afin de confirmer ce résultat, nous avons conditionné le milieu LB par la souche EDL 933 délétée du gène *luxS*, et donc incapable de produire l'AI-2 et l'AI-3. La mesure de l'activité β -galactosidase de la souche TEVS232 confirme bien l'absence d'AI-3 dans ce milieu. La souche EDL 933 produit la même quantité de Stx2 dans ce milieu conditionné par le mutant *luxS* que dans le milieu conditionné par la souche sauvage (figure 43). Les mêmes résultats ont été obtenus dans un milieu synthétique, le DMEM, conditionné ou non par la souche sauvage EDL 933 ou son mutant *luxS*.

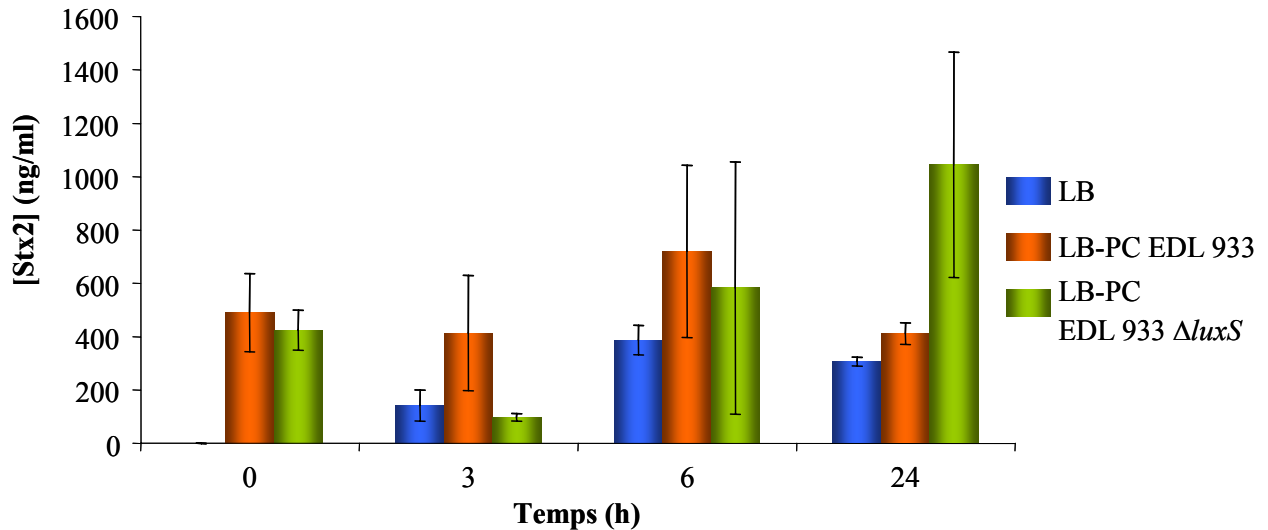


Figure 43 : Quantité de Stx2 dans le milieu LB conditionné (PC) par la souche EDL 933 et le mutant EDL 933 $\Delta luxS$.

Les couleurs des barres indiquent le conditionnement du milieu. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

Pour confirmer ces résultats, nous avons quantifié la production de Stx2 chez le mutant *luxS* dans du milieu DMEM non conditionné. Nous avons de plus regardé l'effet de la mutation d'un gène impliqué dans la réponse au signal AI-3 épinéphrine/norépinéphrine, le gène *qseA*, dont le produit active l'expression du LEE. Le gène *qseA* nous a particulièrement intéressé car des études réalisées par le groupe de Sperandio ayant fait l'objet de communications affichées en congrès mais non encore publiées, montraient que sa délétion provoquait la diminution de l'expression des gènes *stx2*. Nous avons donc étudié la production de toxine Stx2 par le mutant isogénique $\Delta qseA$ de la souche EDL 933 cultivée en milieu DMEM, dans les mêmes conditions que celles utilisées par le groupe de Sperandio.

Une première investigation a été de comparer les croissances des 2 souches mutantes avec celle de la souche parentale EDL 933 dans le milieu DMEM (figure 44). Nous pouvons aisément constater que ces 2 souches mutantes ne montrent pas d'altération de la croissance par rapport à la souche sauvage ($\mu = 1,18 \text{ h}^{-1}$ et $0,98 \text{ h}^{-1}$ vs $1,05 \text{ h}^{-1}$) et atteignent la phase stationnaire à $1,2 \cdot 10^9$ bactéries/ml au bout de 6 heures. Ces 3 souches sont également sensibles à la MC. En effet, leurs taux d'accroissement de population sont respectivement de $1,01 \text{ h}^{-1}$ (wt), $1,14 \text{ h}^{-1}$ ($\Delta luxS$) et $0,91 \text{ h}^{-1}$ ($\Delta qseA$) pendant 2h jusqu'à une densité bactérienne de $7,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, puis une lyse est observée pour les 3 souches jusqu'à 10^8 bactéries/ml au temps 6 h après ajout de la MC.

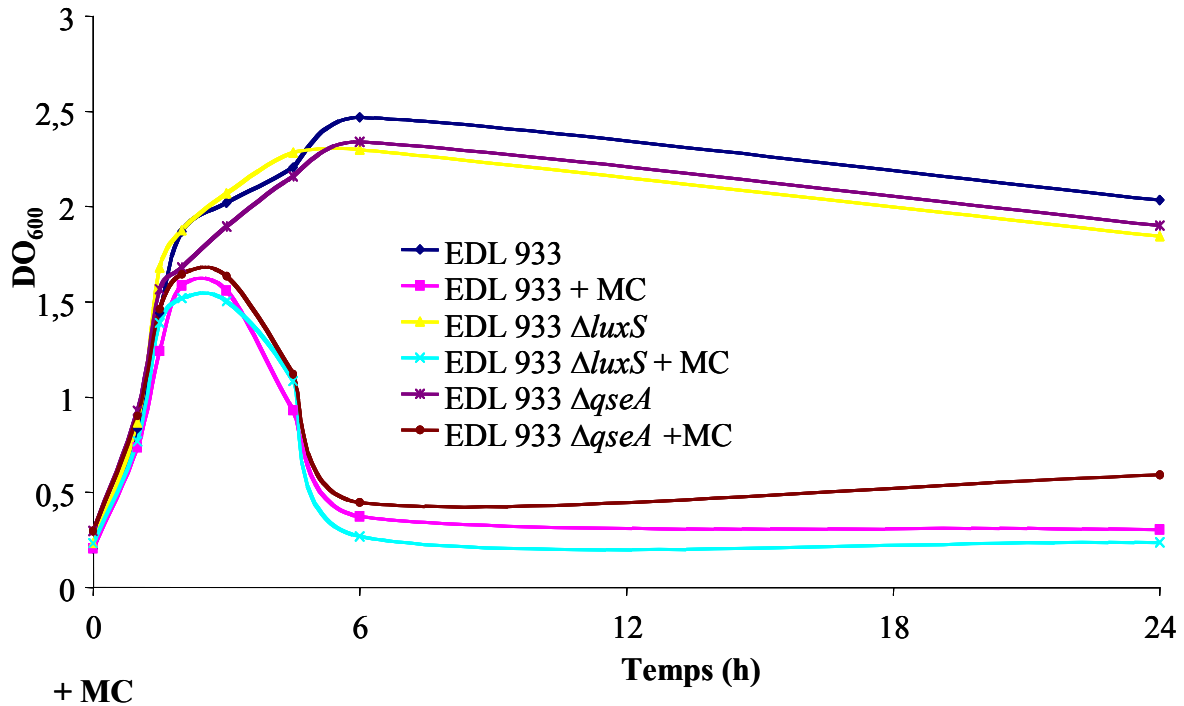


Figure 44 : Croissance de EDL 933 et des mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$ en DMEM en absence ou en présence de mitomycine C

Nous avons ensuite suivi l'expression du gène *stx2* par PCR quantitative et la production de toxine Stx2 par ELISA au cours du temps. La quantité de toxine Stx2 libérée par les 2 souches mutantes n'est pas différente de celle libérée par la souche sauvage. Toutefois, à 1 h 30 il semble que la souche délétée du gène *qseA* produise une quantité de Stx2 plus élevée que les 2 autres souches. Cette différence n'est cependant plus visible après 3 h de culture (figure 45).

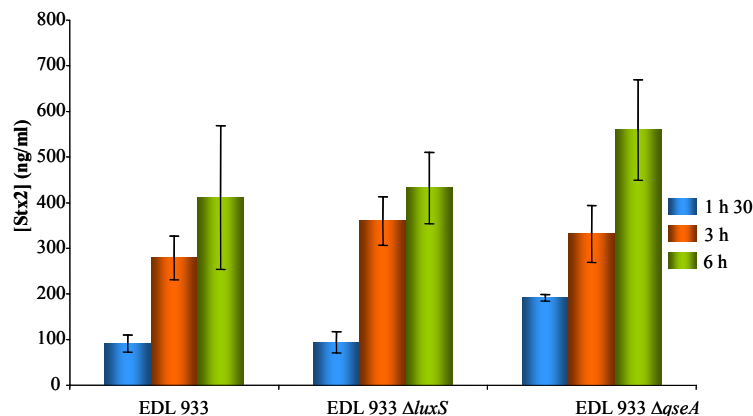


Figure 45 : Production de Stx2 par EDL 933 et des mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$ en DMEM en absence de mitomycine C. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

De plus, cette différence n'existe plus lorsqu'on mesure la quantité d'ARNm accumulés par les différentes souches (figure 46). En effet, les 3 souches présentent la même quantité de

transcrits *stx2* au 3 temps étudiés, ce qui suggère que la différence observée en ELISA ne reflète pas une réalité biologique.

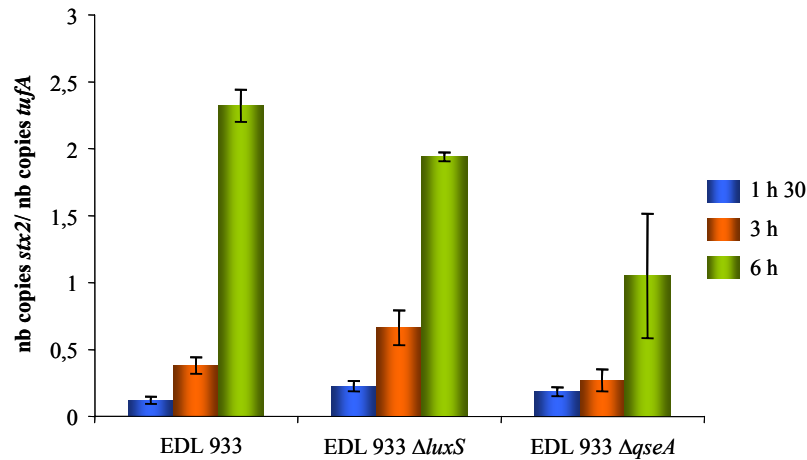


Figure 46 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de *stx2* en DMEM sans mitomycine C chez EDL 933 et les mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

Nous avons aussi étudié la production de Stx2 par ces trois souches après un traitement à la MC. En effet, si le quorum sensing régule positivement la réponse SOS comme le suggère Sperandio (Sperandio *et al.*, 2001), son effet sur la production de Stx2 pourrait être plus visible dans des conditions où cette réponse se met en place. Le dosage de Stx2 dans les surnageants de culture a révélé que la souche EDL 933 $\Delta luxS$ libérait la même quantité de toxine que la souche sauvage (Figure 47), et que cette production était bien induite de 50 à 1000 fois par le traitement à la MC. En revanche, la souche EDL 933 $\Delta qseA$ produit moins de toxine Stx2 en présence de MC que la souche sauvage.

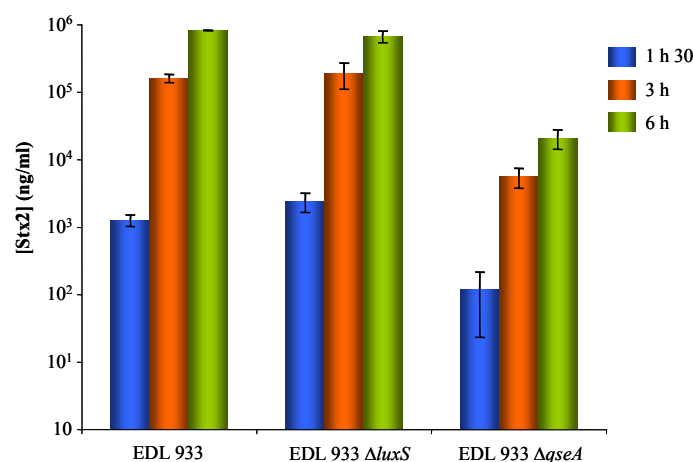


Figure 47 : Quantité de toxine Stx2 produite en DMEM par la souche EDL 933 et les mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$. Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

Ces résultats ont été confirmés en PCR quantitative, où l'on n'a observé aucune différence entre les souches EDL 933 et EDL 933 $\Delta luxS$, tandis que le mutant EDL 933 $\Delta qseA$ produit moins d'ARNm *stx2* que la souche sauvage (figure 48A). Une induction par la MC est cependant bien visible puisque la quantité d'ARNm *stx2* est augmentée d'un facteur 17 à 3 h. La réponse SOS est effectivement induite dans le mutant $\Delta qseA$ en présence de MC, puisque nous avons mesuré des taux d'ARNm *recA* identiques dans la souche sauvage et dans le mutant (Figure 48B).

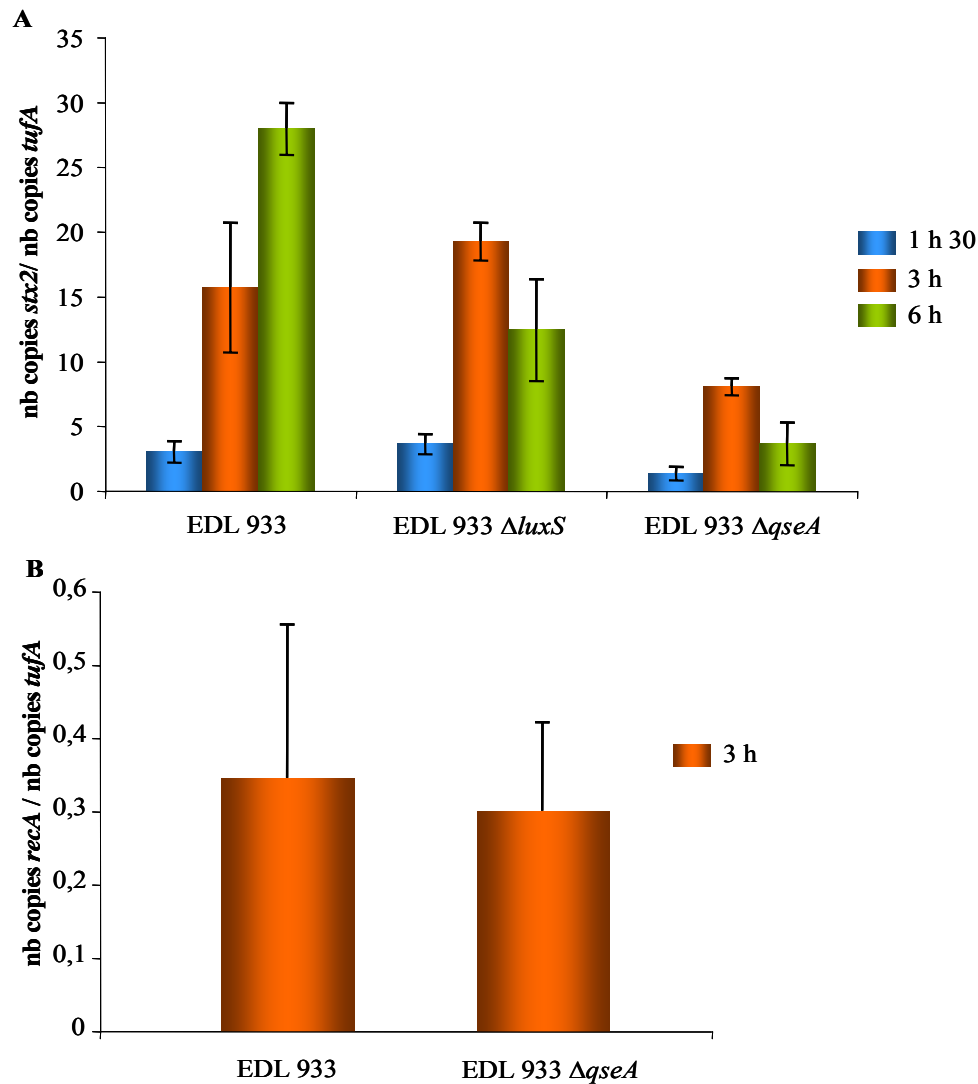


Figure 48 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de *stx2* (A) et de *recA* (B) en milieu DMEM en présence de mitomycine C.

A: chez EDL 933 et les mutants EDL 933 $\Delta luxS$ et EDL 933 $\Delta qseA$; **B:** chez EDL 933 et EDL 933 $\Delta qseA$. Les valeurs indiquées sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

Le mécanisme de l'activation de l'expression de *stx2* par QseA n'est pas déterminé. Si ce mécanisme fait intervenir le quorum sensing, le signal activant QseA reste à déterminer. En effet, nos résultats montrent que ce n'est vraisemblablement ni l'AI-2, ni l'AI-

3/norépinéphrine puisque cette inhibition de l'expression de *stx2* n'est pas observée dans le mutant $\Delta luxS$. Nous avons tout de même testé directement l'action de la norépinéphrine sur la production de toxine Stx2 en DMEM. L'épinéphrine et la norépinéphrine ayant été décrits comme des inducteurs de croissance (Lyte *et al.*, 1993), nous avons dans un premier temps regardé si la norépinéphrine avait un effet sur la croissance de la souche EDL 933, et observé que cela n'était pas le cas (figure 49). En effet, les taux d'accroissement ne sont pas significativement différents ($\mu = 0,65 \text{ h}^{-1}$ vs $0,58 \text{ h}^{-1}$) et la phase stationnaire de croissance est atteinte au bout de 6 h de culture dans les 2 cas.

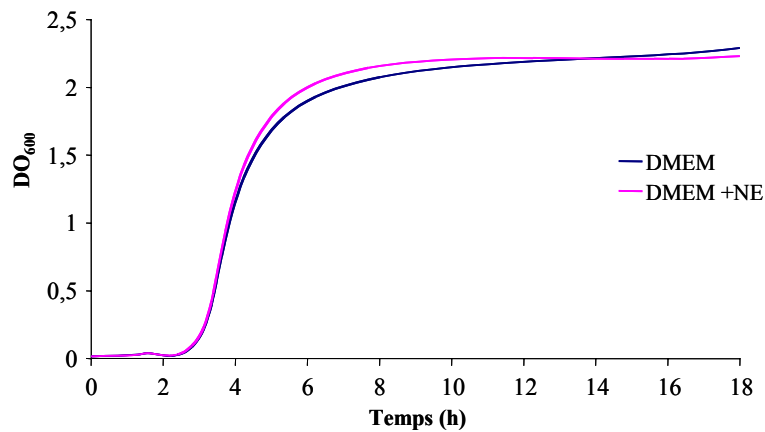


Figure 49 : Croissance de EDL 933 en DMEM supplémenté en norépinéphrine (NE).

De plus l'ajout de la norépinéphrine dans le milieu de culture n'a aucun effet sur la production de Stx2 par EDL 933 en DMEM (figure 50). Les mêmes résultats ont été obtenus en milieu minimum M9. Le système AI-3 épinéphrine/norépinéphrine n'est donc pas impliqué dans la régulation de la production de toxine Stx2 par les EHEC.

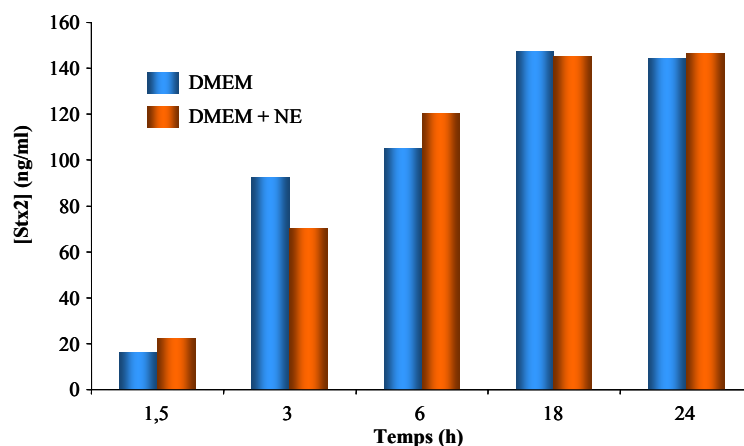


Figure 50 : Quantité de toxine Stx2 produite par EDL 933 en DMEM supplémenté ou non avec 50µM de norépinéphrine (NE).

Les valeurs sont la moyenne de 2 expérimentations indépendantes.

DISCUSSION

Nous avons recherché dans ce chapitre si des facteurs environnementaux, dont on sait qu'ils sont présents dans le tube digestif des mammifères, et dont un effet sur la réponse SOS de *E. coli* ou sur l'expression des facteurs de virulence de *E. coli* O157:H7 a été démontré, ont une influence sur la synthèse de Stx2 *in vitro*.

Nous n'avons pas observé d'effet notable de la spermine exogène sur la production de Stx2. La spermine n'est pas produite par les bactéries, mais est apportée dans l'intestin par l'alimentation et est produite par les cellules épithéliales. Nous l'avons choisie dans notre étude car, possédant 4 fonctions amines, c'est la polyamine la plus biologiquement active (Oh and Kim, 1999). Il serait intéressant de tester les autres polyamines (la cadavérine, une mono amine produite uniquement par les procaryotes, la putrescine et la spermidine, respectivement di et tri amines), soit seules, soit en cocktail. Pour trancher sur le rôle des polyamines sur la synthèse de Stx2, il faut s'assurer que le mutant que nous avons construit ($\Delta speB\Delta speC$) est bien déficient en polyamines, et en construire un autre si ce n'est pas le cas. Cependant, les EHEC sauvages qui sont ingérées et se retrouvent dans la lumière intestinale synthétisent des polyamines. Pour que les polyamines exogènes aient un effet sur la réponse SOS, il faudrait donc que le pool intracellulaire de polyamines endogènes soit faible. On connaît très peu de choses sur les variations de concentration intracellulaire en polyamines chez les procaryotes. S'il a été montré que certains régimes favorisent la production de polyamines par le microbiote intestinal (Noack *et al.*, 1998; Noack *et al.*, 2000), on ne connaît pas quelles sont les conditions qui déplètent le pool intracellulaire de polyamines chez *E. coli*. Par conséquent, même si les polyamines sont nécessaires à l'induction maximale de la réponse SOS chez *E. coli* O157:H7 *in vitro*, comme cela est le cas chez *E. coli* K12, la pertinence de cette régulation *in vivo* restera à démontrer.

Nous nous sommes également intéressés au quorum sensing, puisqu'il a été montré que les signaux qui activent ce mécanisme de régulation peuvent être produits par le microbiote intestinal humain (Sperandio *et al.*, 2003), et que l'expression de plusieurs facteurs de virulence chez *E. coli* O157:H7 est régulée de cette façon. De plus, les données de la littérature concernant la régulation de Stx2 par le quorum sensing sont contradictoires. Cela peut être dû au fait que les différents auteurs n'utilisent pas les mêmes milieux de culture, ni

les mêmes souches EHEC. Nous avons choisi de travailler sur la souche EDL 933, car son génome est entièrement séquencé. Le groupe de Sperandio, qui s'est le plus intéressé à la régulation de l'expression des facteurs de virulence des EHEC par le quorum sensing, travaille sur la souche O157 :H7 86-24, car cette souche ne produit pas Stx1. Cependant, son génome n'est pas séquencé, et il est possible que les phages codant Stx2 chez EDL 933 et 86-24 ne soient pas identiques, et qu'ils ne répondent pas exactement de la même façon aux signaux qui induisent la phase lytique, et donc l'expression de *stx2*. Il a en effet été montré que les phages *stx2* sont très polymorphes, même au sein d'un même sérotype (Gamage *et al.*, 2004b). De plus, il existe peut être des régulations croisées lorsque plusieurs phages *stx* cohabitent dans la même cellule bactérienne.

Nous avons montré que la souche EDL 933 produit la même quantité de Stx2 dans un milieu conditionné par elle-même ou par son mutant isogénique $\Delta luxS$ et dans un milieu non conditionné, en LB et en DMEM. Ceci indique que, si une régulation par le quorum sensing existe, le signal n'est pas un auto inducteur produit par la souche EDL 933 elle-même, et en particulier n'est ni l'AI-2, ni l'AI-3. Une autre possibilité est que la souche EDL 933 produise bien un auto inducteur qui régule la production de Stx2 par le quorum sensing, mais que cet auto inducteur ne soit pas synthétisé ou soit inactif dans les conditions de culture utilisées.

Nous avons également montré que la norépinéphrine n'a pas d'influence sur la production de Stx2. Cette hormone utilisant la même voie de transduction du signal que l'AI-3, ceci confirme que l'AI-3 ne contrôle vraisemblablement pas l'expression de Stx2.

L'observation la plus intéressante est que chez un mutant $\Delta qseA$ le gène *stx2* est moins exprimé que chez la souche sauvage, et que par conséquent Stx2 est moins produite, mais uniquement lorsque la réponse SOS est induite, c'est-à-dire en présence de MC. Ce résultat suggère que QseA est activateur de la synthèse de Stx2 en favorisant l'expression maximale de *stx2* lors de la mise en place de la réponse SOS. Le mode d'action de QseA sur la réponse SOS reste à déterminer. Il pourrait soit participer à la stimulation de l'activité de la protéine RecA, soit interférer avec l'autoclivage du répresseur *c1* ou limiter l'activité des promoteurs phagiques. Il serait intéressant de compléter cette étude par l'analyse de l'expression d'autres gènes contrôlés par RecA (*lexA*, *uvrA*, *sulA*, *umuC*...), et par la quantification des phages *stx2* produits en présence de MC dans le mutant $\Delta qseA$. Le groupe de Sperandio a montré que QseA fait partie d'une voie d'activation de l'expression des gènes du LEE contrôlée par le quorum sensing (Sperandio *et al.*, 2002). On peut se poser la question de savoir si QseA répond aussi au quorum sensing pour réguler l'expression de *stx2*. Si c'est le cas, quel serait

alors le signal activateur du quorum sensing, puisque ce n'est pas l'AI-3 comme pour l'activation de l'expression des gènes du LEE ? Et si le quorum sensing n'est pas impliqué, la MC elle-même, ou bien l'altération de l'ADN sous l'action de la MC pourrait activer l'expression de *qseA*. Ce ne semble pas être le cas, car nous avons observé que l'expression de *qseA* n'est pas induite en présence de MC. Cependant, l'activité de QseA pourrait être stimulée dans ces conditions. Pour répondre à ces questions et comprendre précisément l'implication de QseA dans la régulation de la synthèse de Stx2, d'autres études seront nécessaires.

CHAPITRE 3

INFLUENCE DU MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN SUR LA SYNTHÈSE DE STX2

RESULTATS

Les études *in vitro* décrites ci-dessus ne nous ont pas permis de mettre en évidence une régulation de l'expression de *stx2* par les signaux actuellement connus pour réguler l'expression d'autres facteurs de virulence des EHEC tels que le LEE ou le flagelle. Cependant, les études *in vitro* sont très restrictives et les milieux utilisés ne sont pas représentatifs du contenu intestinal humain, qui est un milieu extrêmement complexe dans lequel de multiples signaux moléculaires sont présents, signaux qui peuvent être émis aussi bien par la flore que par les cellules de l'hôte. Notre but a donc été d'étudier la production de Stx2 par les EHEC dans un milieu mimant le plus exactement possible le contenu intestinal humain, et c'est pour cette raison que nous avons utilisé un modèle de rat à flore humaine couramment utilisé au laboratoire. Ce modèle de rat à flore humaine nous a permis d'obtenir du contenu intestinal de rat reflétant assez bien ce que peut être le contenu intestinal humain, le milieu auquel sont confrontées les EHEC en conditions physiopathologiques.

1 - RATS A MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN

Afin de déterminer si le microbiote humain avait une influence sur la production de Stx2 par les EHEC, nous avons utilisé un modèle de rats à flore humaine. Deux groupes de rats axéniques âgés de huit semaines ont été inoculés par voie orale avec une dilution 10^{-3} d'une flore fécale humaine. Un groupe a reçu une flore provenant d'un adulte, et l'autre une flore provenant d'un enfant âgé de 3 ans, les enfants de moins de 5 ans étant les personnes les plus

sensibles à une infection par les EHEC. Un troisième groupe de rats, le groupe contrôle, n'a pas été inoculé. La correcte implantation du microbiote a été vérifiée au bout de 7 jours par dénombrement des bactéries anaérobies, anaérobies facultatives et entérobactéries, ainsi que par une coloration de Gram afin de voir de façon qualitative s'il existait une bonne diversité microbienne. Quatorze jours après l'implantation du microbiote, les flores fécales ont de nouveau été dénombrées pour les bactéries anaérobies, les bactéries anaérobies facultatives et les entérobactéries. Les résultats obtenus (figure 51) montrent que ces flores fécales présentent des niveaux de population de ces 3 groupes de bactéries analogues à un microbiote humain, comme cela a déjà été décrit dans ce modèle (Bernbom *et al.*, 2006). Cependant ces seuls résultats ne permettent pas d'affirmer que les rats possèdent bien une flore humaine. Etudier la diversité d'espèces présentes par une technique moléculaire (TTGE par exemple) et comparer les résultats avec ceux obtenus par la même technique sur les selles d'origine, nous permettra d'arriver à une telle conclusion.

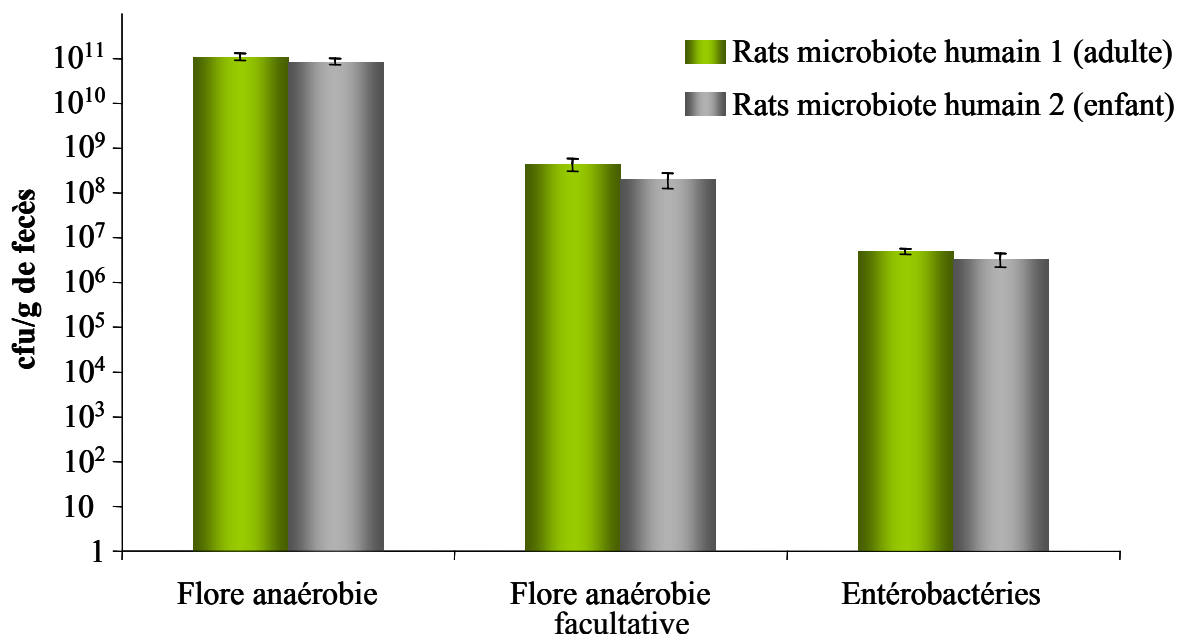


Figure 51 : Dénombrement des différentes flores bactériennes présentes dans les fecès des rats à flore humaine 14 jours après inoculation.

Les valeurs sont la moyenne de 3 dénombrements indépendants

Quatorze jours après inoculation, les rats ont été sacrifiés, les contenus cecaux ont été prélevés et ont servi à l'élaboration du milieu HMC (rats à microbiote humain), et du milieu GFC (rats axéniques) après l'élimination du microbiote et/ou et des particules solides par centrifugation et filtration 0,2 μm , ajustement du pH et ajout de nutriments (voir Matériel et Méthodes).

1-1. Croissance de la souche EDL 933 dans les milieux HMC et GFC.

Nous avons tout d'abord comparé la croissance de la souche EDL 933 dans les 2 milieux. Pour cela, nous avons cultivé la souche EHEC de référence EDL 933 dans les milieux HMC et GFC à 37 °C sous agitation constante de 225 rpm et procédé à des dénombrements au cours du temps (figure 52). La souche EDL 933 présente le même profil de croissance dans les deux milieux avec un taux d'accroissement de $\mu = 1,4 \text{ h}^{-1}$. La phase stationnaire est atteinte au bout de 5 à 6 h, et la densité bactérienne atteinte est de l'ordre de $3-4 \times 10^9$ bactéries/ml. Nous pouvons donc en conclure que les métabolites produits par le microbiote dans les contenus cécaux des rats à flore humaine n'ont pas d'influence sur la croissance de la souche EDL 933.

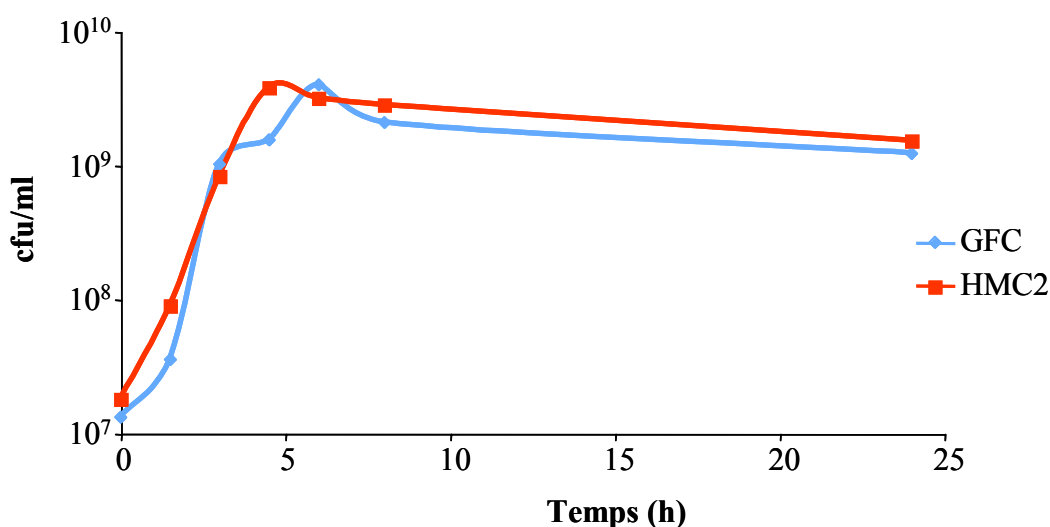


Figure 52 : Courbe représentative de la croissance de EDL 933 dans les milieux issus de rats axéniques (GFC) ou de rats à flore humaine (HMC2, microbiote d'enfant).

1-2. Synthèse de Stx2 dans les milieux HMC et GFC

La production de Stx2 par la souche EDL 933 dans les milieux GFC et HMC a été mesurée par ELISA après 6 h et 24 h de croissance. Nous avons observé que la production de toxine Stx2 dans les 2 milieux HMC ne représente que 30% et 10% (HMC1, microbiote d'adulte et HMC2, microbiote d'enfant respectivement) de la production de Stx2 observée dans le milieu GFC (figure 53 A). Nous nous sommes ensuite attachés à savoir si cette inhibition intervenait au niveau transcriptionnel ou était consécutive à une dégradation de la toxine dans le milieu HMC. L'analyse par RT-PCR quantitative a révélé que la diminution de la quantité de toxine Stx2 observée dans les surnageants est consécutive à une diminution de la transcription du gène *stx2* dans les milieux HMC (figure 53 B). En effet, la quantité de transcrits *stx2* est diminuée de plus de 90% dans les milieux HMC comparativement aux milieux GFC. De plus,

en incubant de la Stx2 purifiée dans les milieux GFC et HMC pendant 48 h à 37 °C, aucune dégradation n'est observée dans aucun des milieux.

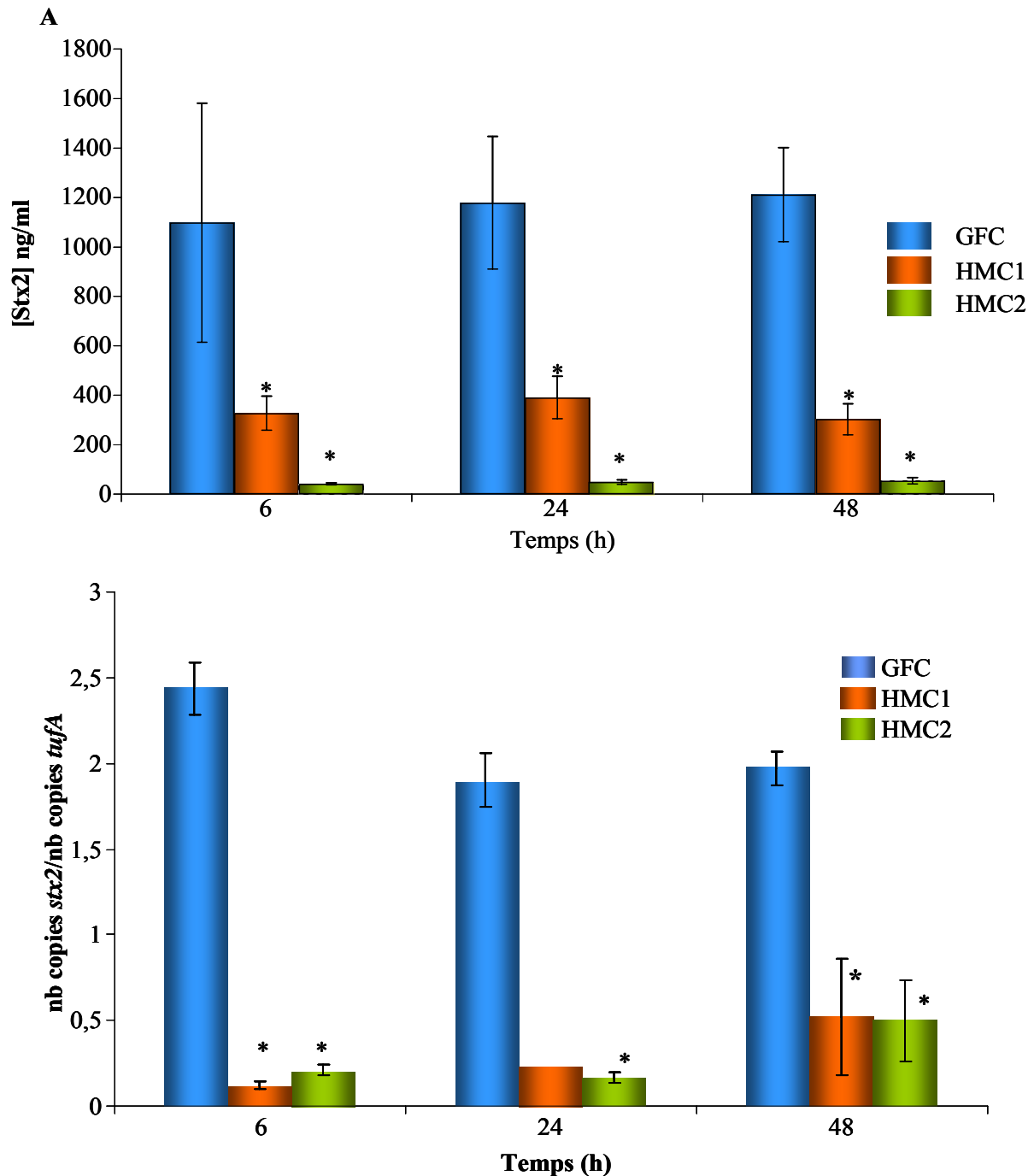


Figure 53 : Synthèse de Stx2 par EDL 933 dans les milieux issus de rats.

Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. La SEM est indiquée par les barres d'erreur. Les astérisques indiquent une différence significative par un test t ($P < 0.05$).

A: concentration de Stx2; B :quantification des ARNm *stx2*.

GFC :milieu issu du contenu cécal de rats axéniques. HMC : milieu issu du contenu cécal de rats associés à un microbiote d'adulte (HMC1) ou d'enfant (HMC2).

2 - MILIEU CC CONDITIONNE PAR LE MICROBIOTE FECAL HUMAIN.

Afin de déterminer si l'inhibition observée dans les milieux HMC était due à une transformation d'un ou plusieurs métabolites produit par l'hôte et transformé par le microbiote, nous avons voulu utiliser un milieu le plus synthétique possible permettant toutefois la culture d'une flore fécale complexe. Nous avons donc utilisé le milieu décrit par Leedle et Hespell (Leedle and Hespell, 1980), le plus couramment utilisé pour cultiver le microbiote intestinal (milieu CC). Nous avons cultivé dans ce milieu 4 microbiotes fécaux différents (provenant de 3 adultes et 1 enfant) en anaérobie pendant 24 h. Après avoir éliminé le microbiote et ajusté les nutriments et le pH, ces milieux ont été utilisés pour cultiver EDL 933. La croissance de la souche EDL 933 est ralentie dans les milieux conditionnés comparativement au milieu non conditionné ($\mu=0,45 \text{ h}^{-1}$; $0,73 \text{ h}^{-1}$; $0,49 \text{ h}^{-1}$ et $0,56 \text{ h}^{-1}$ vs $0,85 \text{ h}^{-1}$) (figure 54). Cependant, au bout de 24 h, la DO_{600} est similaire dans tous les milieux (environ 3,5).

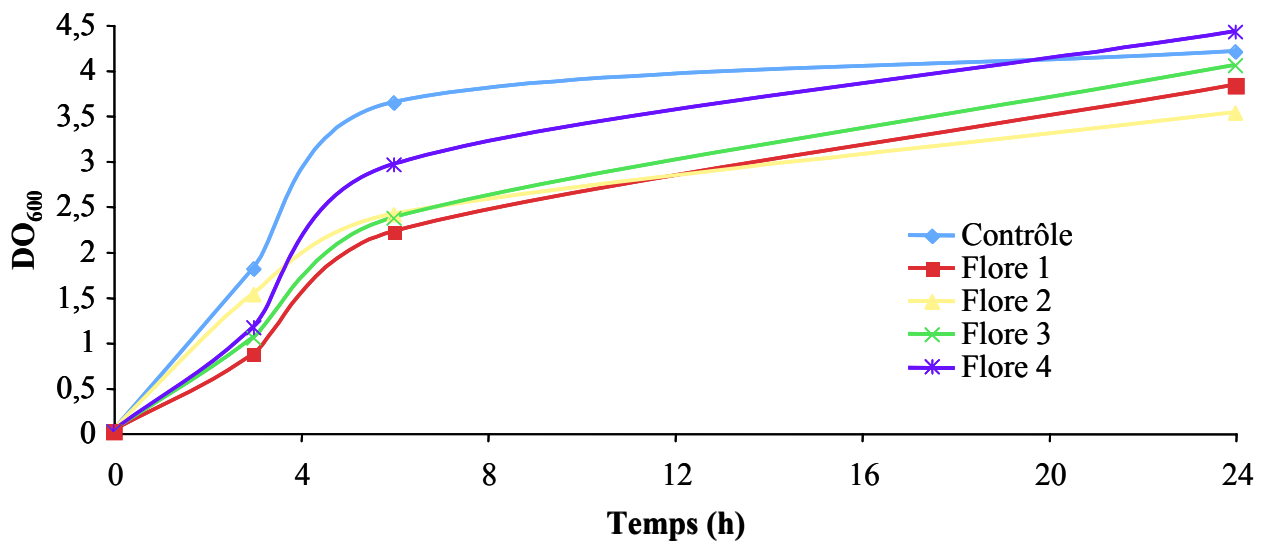


Figure 54 : Courbes de croissance représentatives de EDL 933 dans les milieux CC conditionnés ou non par les microbiotes fécaux de quatre individus différents.

La flore 2 est un microbiote d'enfant. Contrôle : milieu non conditionné.

2-1. Synthèse de Stx2 dans le milieu CC

La quantité de Stx2 produite dans le milieu de culture par la souche EDL 933 a été évaluée par ELISA (figure 55 A). La concentration de Stx2 présente dans le milieu CC non conditionné est plus faible que celle retrouvée dans le milieu GFC. Néanmoins, nous avons observé une différence significative entre la quantité de Stx2 présente dans le milieu CC non

conditionné comparativement au milieu CC conditionné, et ce quelles que soient les flores utilisées pour le conditionnement. Afin d'être sûr que les différences observées n'étaient pas dues à la moindre croissance de EDL 933 dans les milieux conditionnés, nous avons ramené la quantité de Stx2 présente dans le surnageant à la concentration bactérienne en faisant le ratio de la concentration en Stx2 sur la densité optique mesurée aux mêmes temps. On a ainsi confirmé l'inhibition de la production de Stx2 dans les milieux conditionnés. Comme dans le milieu HMC, l'inhibition de la synthèse de Stx2 dans les milieux CC s'exerce au niveau transcriptionnel. On observe en effet une diminution de la quantité d'ARNm *stx2* (figure 55 B). De par la technique de PCR en temps réel utilisée, les quantités d'ARNm *stx2* calculées tiennent compte de la concentration bactérienne puisqu'elles sont ramenées au nombre de copies d'un gène de ménage.

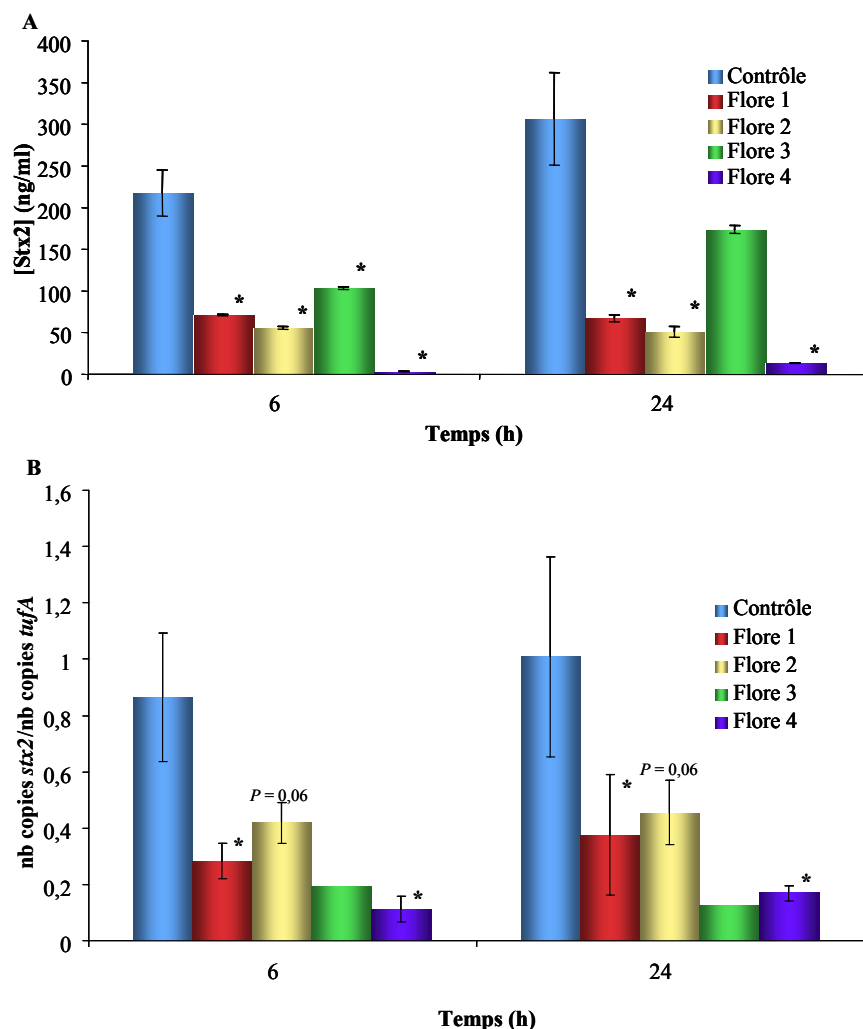


Figure 55 : Quantification de Stx2 dans le surnageant de culture de la souche EDL 933 dans les milieux CC conditionnés ou non par les flores fécales de quatre individus.

Les valeurs sont les moyennes d'au moins 3 expérimentations indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative par un test *t* ($P < 0.05$). Contrôle : milieu non conditionné.

A: Concentration de Stx2 ; B : Quantification des ARNm *stx2*

2-2. Expression de *recA* dans le milieu CC

Afin de comprendre le mécanisme par lequel le microbiote fécal inhibe la production de Stx2, nous avons étudié l'expression du gène codant la protéine majeure de la réponse SOS : le gène *recA*. Cette étude a été faite en RT-PCR quantitative et nous avons constaté que le gène *recA* était sous exprimé dans les bactéries cultivées en présence des métabolites produits par le microbiote, comparativement aux bactéries cultivées en milieu non conditionné (figure 56). La production réduite de toxine Stx2 dans les milieux conditionnés est donc vraisemblablement due à une inhibition de l'induction spontanée du système SOS RecA dépendante.

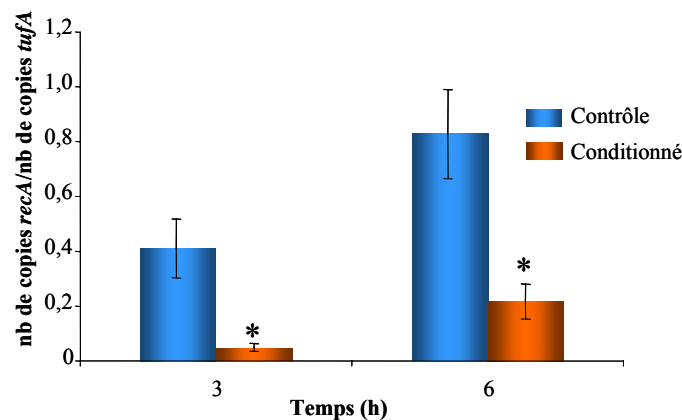


Figure 56 : Analyse transcriptionnelle du gène *recA* dans le milieu CC non conditionné (contrôle) et conditionné.

Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative par un test *t* ($P < 0.05$).

2-3. Influence du microbiote sur la synthèse de Stx2 en conditions induites

Afin d'établir si l'inhibition observée en conditions normales de culture était aussi observée en conditions induites, nous avons utilisé un antibiotique de la classe des fluoroquinolones, la ciprofloxacine, qui empêche la réplication de l'ADN et ainsi induit le système SOS bactérien. Cet antibiotique est largement utilisé en médecine, en particulier aux Etats-Unis. Nous avons tout d'abord testé plusieurs concentrations de ciprofloxacine sur des cultures en LB de la souche EDL 933 à 10^8 bactéries/ml. Les concentrations testées ont été 25, 50, 75 et 100 ng/ml. Nous avons ainsi établi qu'une concentration de 25 ng/ml était suffisante pour induire 3 h après une lyse cellulaire telle qu'on l'observait en LB avec la MC, donc vraisemblablement la réponse SOS et l'induction des phages. Effectivement, la concentration en Stx2 est plus importante en présence de ciprofloxacine qu'en son absence (figure 57), alors

que la densité bactérienne est plus faible à cause de la lyse induite par la ciprofloxacine. Ceci indique que l'antibiotique a induit la réponse SOS et l'induction de la phase lytique du phage *stx2*. Cette induction de la synthèse de Stx2 est visible aussi bien dans les milieux conditionnés par les microbiotes que dans le milieu non conditionné. Cependant, la quantité de Stx2 retrouvée dans les milieux conditionnés apparaît plus faible que dans le milieu non conditionné.

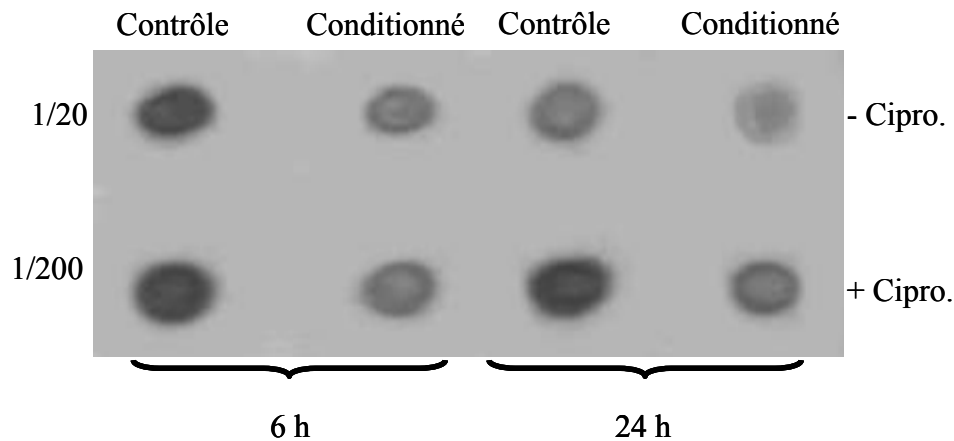


Figure 57 : Analyse en Dot-Blot de la concentration de Stx2 dans les milieux CC contrôle et conditionné après 6 h et 24 h de culture.

La membrane présentée est représentative de 3 expérimentations indépendantes. Les échantillons obtenus en présence de ciprofloxacine sont 10 fois plus dilués que les échantillons obtenus sans ciprofloxacine. Cipro : en absence de ciprofloxacine; + Cipro : en présence de ciprofloxacine.

Pour des raisons que nous n'avons pas pu déterminer, le dosage de la quantité d'ARNm *stx2* en RT-PCR quantitative s'est avéré non reproductible et nous n'avons pas pu obtenir de résultats fiables permettant de confirmer que l'inhibition de la synthèse de Stx2 par les milieux conditionnés, en présence de ciprofloxacine, s'exerçait au niveau transcriptionnel. Nous avons alors analysé l'expression de *recA* dans ces différentes conditions (figure 58).

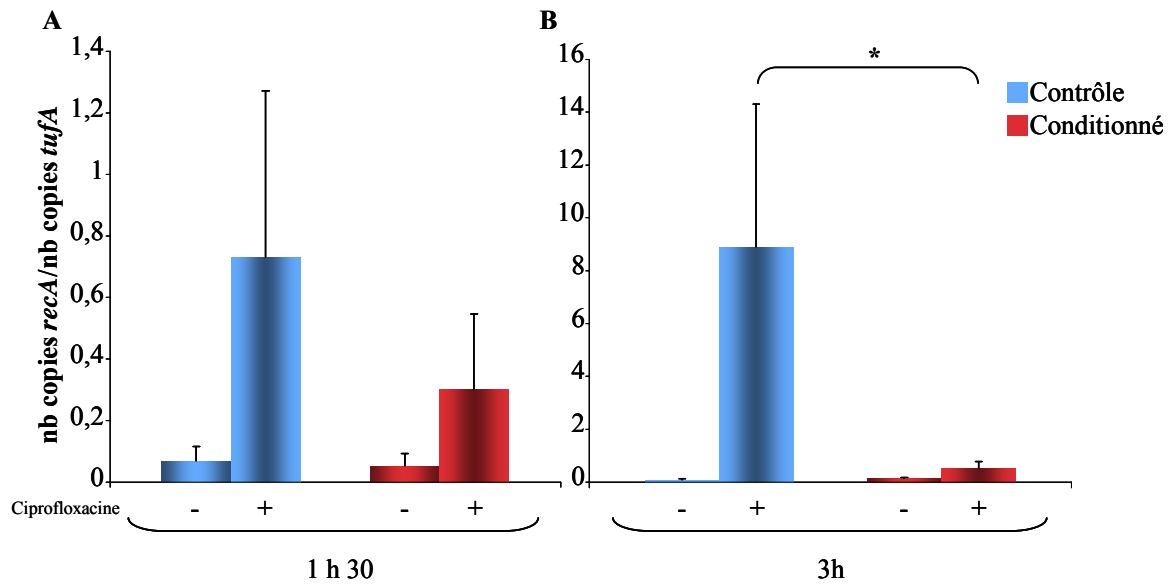


Figure 58 : Analyse transcriptionnelle de l'expression de *recA* dans le milieu CC contrôlé et conditionné en absence et en présence de ciprofloxacine .

Les valeurs sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. * indique une différence significative par un test *t* ($P < 0,05$).

A : Après 1 h 30; B : Après 3 h

Comme attendu, l'expression du gène *recA* est très fortement induite par l'ajout de la ciprofloxacine, et ce quel que soit le milieu. Cependant, à 3 h, les taux d'induction de *recA* sont significativement plus faibles dans le milieu conditionné par le microbiote humain que dans le milieu contrôlé. Ce résultat suggère fortement que l'inhibition de la synthèse de Stx2 par les milieux conditionnés, en présence de ciprofloxacine, est bien due à une moindre induction de la réponse SOS, et que le conditionnement du milieu par un microbiote fécal humain possède une activité inhibitrice sur la transcription de *recA*, aussi bien en conditions induites que non induites.

3 - CARACTERISATION DES ESPECES BACTERIENNES RESPONSABLES DE L'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE STX2.

Afin de caractériser la ou les espèces bactériennes responsables de l'inhibition de la production de toxine Stx2, nous avons conditionné le milieu CC avec des espèces bactériennes classiquement retrouvées dans le microbiote fécal humain. Ces espèces ont servi à ensemercer le milieu CC en cultures mono, di ou tri-associées. Huit espèces ont ainsi été testées pour leur pouvoir d'inhibition de la production de Stx2 : *Bacteroides sp.* (C134, *thetaitaomicron*), *Roseburia sp.* (C111), *Ruminococcus calidus*, *Lactobacillus reuteri*,

Clostridium leptum, *Clostridium coccoïdes*, *Bifidobacterium breve*. De même que dans le cas des milieux conditionnés par les flores fécales, la croissance de la souche EDL 933 est affectée par le conditionnement par les espèces pures. En effet, les taux de croissance dans les milieux conditionnés sont légèrement inférieurs ($\mu=0,6 \text{ h}^{-1}$ à $\mu=0,92 \text{ h}^{-1}$) à celui observé dans le milieu contrôle ($\mu=0,92 \text{ h}^{-1}$) suivant les espèces ayant servi au conditionnement. Nous avons quantifié par ELISA la quantité de Stx2 produite. Les résultats obtenus après 6 h et 24 h de culture sont présentés figure 59. Nous observons que certaines espèces (*B. breve*, *Roseburia C111*) possèdent un effet activateur de la production de Stx2. En effet, les milieux conditionnés par ces 2 espèces augmentent de 1,5 à 2,5 fois la production de toxine Stx2 par EDL 933, que ce soit à 6 h ou à 24 h. D'autres espèces en revanche, comme *B. thetaiotaomicron*, possèdent un effet inhibiteur (diminue de 50% la production de toxine), que ce soit seul ou en association avec d'autres espèces qui n'activent pas la production de Stx2. Quand *B. thetaiotaomicron* est associé avec une espèce qui active la production de Stx2, l'effet de cette dernière est amoindri, voire annulé.

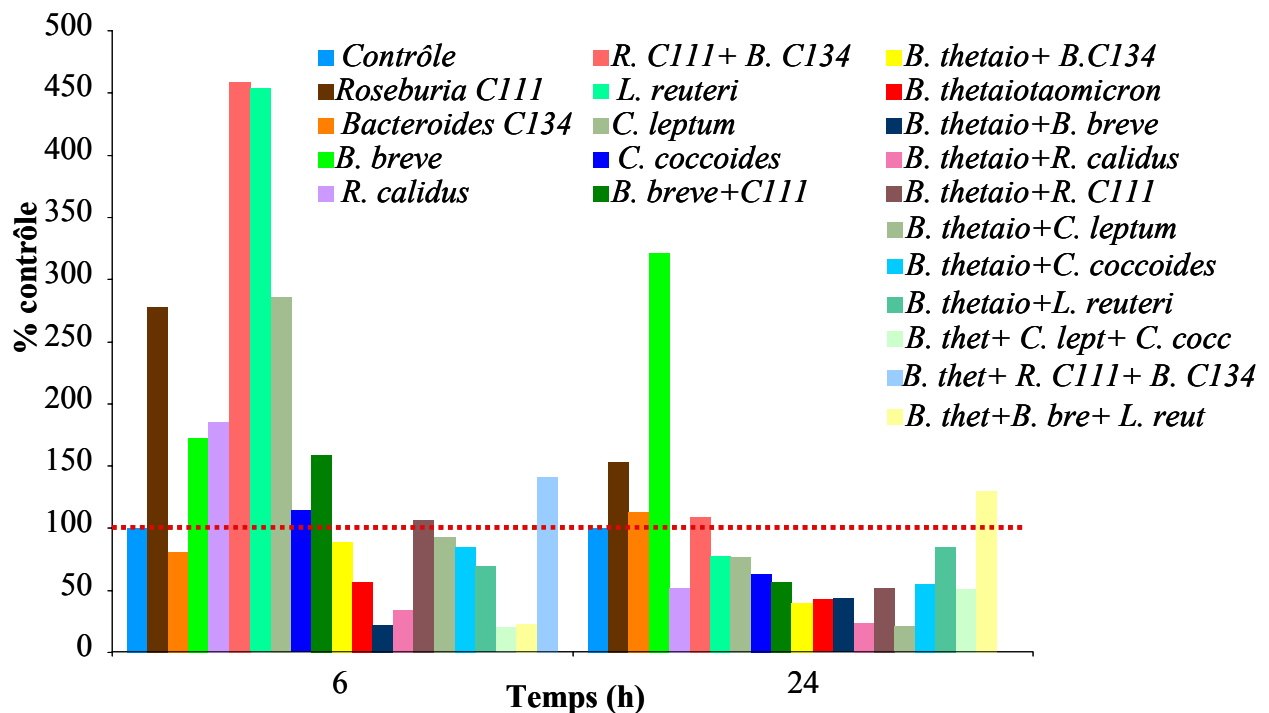


Figure 59 : Production de toxine Stx2 par la souche EDL 933 en milieux CC conditionnés par certaines espèces bactériennes classiquement retrouvées dans les flores fécales.

Les valeurs sont données en % de la production de Stx2 par EDL 933 en milieu CC non conditionné. La ligne pointillée rouge indique le 100%. Chaque barre correspond à une espèce en monoculture ou à plusieurs espèces en coculture.

Ces résultats n'ont pas été confirmés par des répliquats biologiques, le but de ces expérimentations ayant été d'obtenir une vision globale sur l'effet d'un grand nombre de

souches afin de pouvoir se focaliser sur une espèce en particulier, ce qui a été fait sur *B. thetaiotaomicron*. Ainsi, nous avons confirmé l'effet inhibiteur de *B. thetaiotaomicron* par plusieurs expériences indépendantes. La croissance de la souche EDL 933 n'est pas affectée par le conditionnement par *B. thetaiotaomicron*. Nous avons observé une inhibition de la production de Stx2 de 50 à 60% à 6 h et 24 h (figure 60). Or nous avons observé une inhibition de 70 à 90% de la production de Stx2 dans les milieux conditionnés par la flore totale à 24 h. L'inhibition par *B. thetaiotaomicron* seul ne semble donc pas expliquer totalement l'inhibition observée dans les milieux conditionnés par les flores fécales. Cette inhibition par *B. thetaiotaomicron* s'exerce vraisemblablement au niveau transcriptionnel puisque des résultats préliminaires montrent qu'à 24 h la transcription du gène *stx2* dans le milieu complet est inférieure de 20% à celle obtenue dans le milieu contrôle.

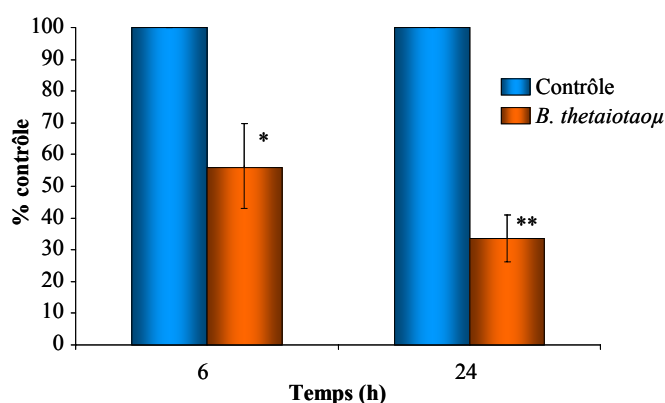


Figure 60 : Production de toxine Stx2 par la souche EDL 933 en milieu CC conditionné par *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Les valeurs sont la moyenne des % de la production de Stx2 par EDL 933 en milieu CC non conditionné (contrôle) (n=4). La SEM est indiquée par les barres d'erreur. * indique une différence significative par un test *t* ($P < 0,05$) et ** indique une différence significative par un test *t* ($P < 0,01$)

4 - IDENTIFICATION DE LA FRACTION INHIBITRICE.

Après avoir identifié une espèce bactérienne présente dans le microbiote fécal responsable de l'inhibition de la synthèse de toxine Stx2, nous avons voulu identifier la taille du ou des composés qui pouvaient avoir un effet inhibiteur sur la production de toxine. Pour cela, nous avons centrifugé le milieu conditionné par le microbiote fécal au travers de filtres successifs afin d'obtenir des fractions qui contiennent des molécules de masses moléculaires différentes. Nous avons ainsi obtenu 3 fractions. La première contient toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 100 kDa, la seconde, toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 10 kDa, et la dernière toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 3 kDa. La souche EDL 933 a étéensemencée dans ces 3 milieux.

Les 3 fractions exerçaient toujours l'effet inhibiteur sur la synthèse de Stx2 (figure 61). La ou les molécules inhibitrices ont donc une masse moléculaire inférieure à 3 kDa.

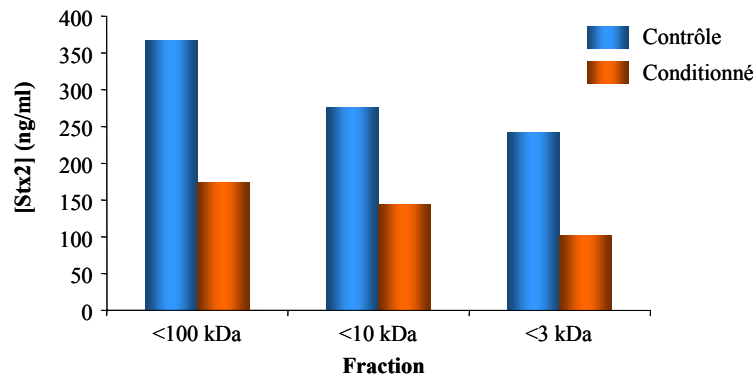


Figure 61 : Production de toxine Stx2 après 24h de culture dans les milieux CC contrôle et conditionné fractionnés par ultrafiltration.

D'autres études (traitement à la chaleur, sensibilité aux protéases, extractions par différents solvants...) sont en cours afin d'identifier la nature biochimique du ou des composés inhibiteurs. De plus la fraction <3 kDa a été analysée par spectrométrie de masse afin d'identifier des composés différentiellement présents dans les milieux CC conditionnés et non conditionnés. Les résultats sont en cours d'analyse au laboratoire.

5 - EFFET DU QUORUM SENSING

Les études concernant l'éventuelle régulation de l'expression de *stx2* par le quorum sensing sont contradictoires (voir chapitre 5-2.2.3). Or, nos résultats suggèrent qu'il pourrait exister un dialogue inter bactérien conduisant à une régulation de la production de toxine Stx2 par le microbiote fécal humain. Les études de Sperandio ont montré que le système à 2 composants QseB-QseC répond au signal AI-3 épinéphrine/norépinéphrine et régule l'expression du flagelle (Clarke and Sperandio, 2005b; Clarke *et al.*, 2006). Le régulateur QseA est aussi impliqué dans la réponse à l'AI-3 par une autre voie et régule l'expression du LEE (Sperandio *et al.*, 2002). Bien que nos études *in vitro* montrent qu'il n'y a pas d'implication de l'AI-3/épinéphrine/norépinéphrine dans la régulation de la production de toxine par les EHEC, il pourrait exister un autre signal de quorum sensing faisant intervenir le régulateur QseA et/ou le système à 2 composants QseBC. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de ces 2 systèmes dans la régulation de l'expression de Stx2. La délétion de *qseA* ou de *qseC* n'affecte pas la production de Stx2 dans les milieux conditionnés par le microbiote fécal. En effet, l'inhibition observée dans ces milieux pour la souche sauvage est à nouveau observée pour les souches mutantes (figure 62). L'inhibition de la production de Stx2 n'utilise donc pas

ces 2 voies de régulation du quorum sensing dans les milieux utilisés. Pour déterminer si de l'AI-3 ou de l'épinéphrine /norépinéphrine étaient présents dans les milieux CC conditionnés, nous avons utilisé une souche reportrice possédant le promoteur de l'opéron *LEE1* (régulé par l'AI-3, l'épinéphrine/norépinéphrine) en amont du gène *lacZ*. Les premiers résultats montrent que ces composés ne sont pas présents dans le milieu conditionné par *B. thetaiotaomicron*.

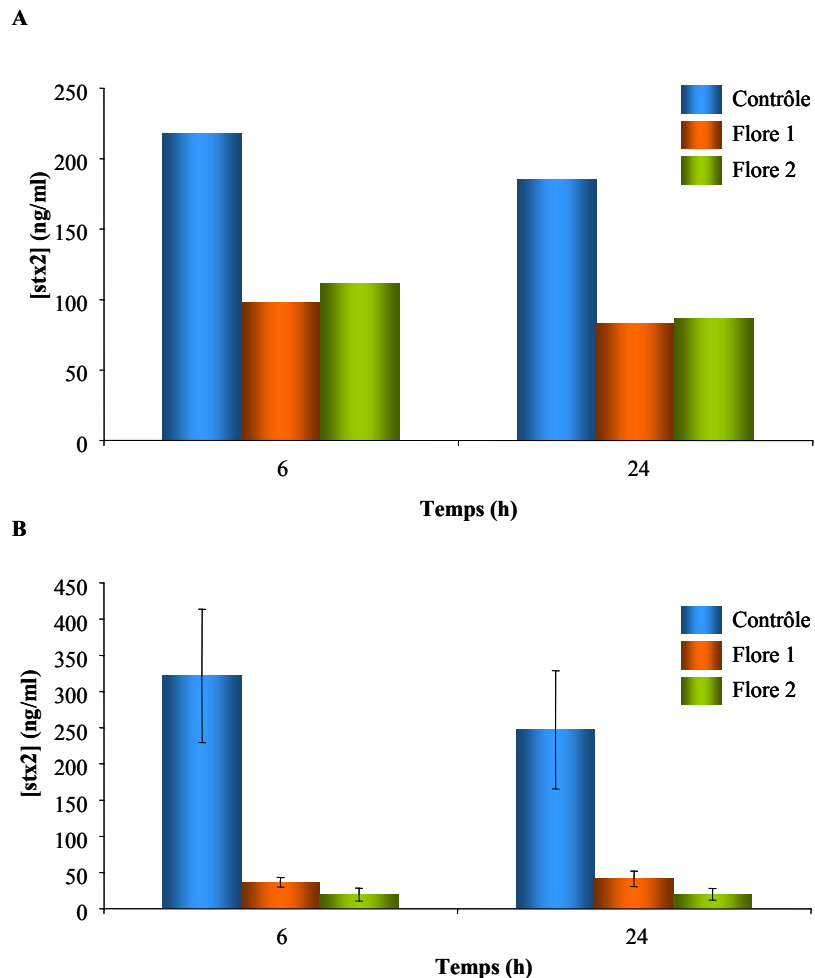


Figure 62 : Production de toxine Stx2 par les souches EDL 933 $\Delta qseA$ (A) et EDL 933 $\Delta qseC$ (B) dans les milieux CC contrôle ou conditionnés.

A Les valeurs indiquées sont issues d'une seule expérimentation

B : Les valeurs indiquées sont la moyenne de 3 expérimentations indépendantes.

Les mutations de *qseA* et *qseC* n'ayant aucun effet, il est possible que la régulation de *stx2* soit médiée par un autre système de quorum sensing. Or il a été montré que les *E. coli* pouvaient répondre à l'indole par le biais du senseur SdiA des AHL (Lee *et al.*, 2007b). Nous avons donc recherché si de l'indole était présent dans ces milieux complexes. L'indole a été dosé par le réactif de Kovacs et il s'est avéré que les milieux conditionnés contenaient moins d'indole que le milieu contrôle (165 μM vs 229 μM). Ces résultats pouvaient nous laisser supposer que l'indole était impliqué dans l'inhibition observée. Nous avons alors regardé si

l'indole pouvait induire la production de toxine Stx2 par la souche EDL 933. L'ajout d'indole dans un milieu synthétique DMEM n'a pas d'effet sur la transcription du gène *stx2* comparativement au milieu contrôle, et cette observation a été confirmée en Dot-Blot Stx2. De plus, des résultats préliminaires sur le mutant EDL 933 délété du gène *sdiA* semblent montrer que cette mutation n'a pas d'effet sur la production de Stx2.

DISCUSSION

Nos résultats démontrent que des facteurs solubles produits par le microbiote fécal humain inhibent la transcription des gènes *stx2*, et donc la synthèse des toxines Stx2, en inhibant la réponse SOS médiée par RecA. L'activation spontanée ou induite de RecA par la ciprofloxacine est inhibée dans les milieux conditionnés. De plus, nous avons montré que l'espèce *B. thetaiotaomicron*, largement présente parmi les espèces composant le microbiote intestinal humain, est principalement responsable de cet effet. Il est bien connu que certaines souches provenant du microbiote exercent des effets antibactériens envers des pathogènes intestinaux, en revanche leur rôle dans la régulation de l'expression de facteurs de virulence sur un plan transcriptionnel est assez peu décrit. Il a été montré que le microbiote intestinal est capable de moduler l'expression de certains gènes eucaryotes des cellules épithéliales régulant diverses fonctions du tube digestif, telles que l'absorption des nutriments ou la fortification de la barrière mucoale (Hooper *et al.*, 2001). Cette aptitude du microbiote à moduler l'expression des gènes n'a pour le moment pas été démontrée sur des gènes procaryotes. En effet, les régulations décrites jusqu'à présent exercées par le microbiote sur l'expression de facteurs de virulence sont post-transcriptionnelles (Lievin-Le Moal and Servin, 2006). La régulation transcriptionnelle exercée par le microbiote sur les cellules eucaryotes laisse toutefois supposer que la régulation de l'expression de facteurs de virulence des pathogènes est possible. Notre travail démontre clairement, et c'est là toute son originalité, que le microbiote humain exerce une action directe sur la transcription du gène codant pour le principal facteur de virulence des EHEC, la toxine Stx2.

La combinaison d'un pH modérément acide (6.75) et de fortes concentrations d'acétate (65 mM) qui a été observée dans un modèle de souris traitées à la streptomycine colonisées par *B. breve* inhibe la production de Stx2 *in vitro* et *in vivo* par un mécanisme inconnu (Asahara *et al.*, 2004). Il n'a pas été recherché si cette inhibition s'exerçait au niveau transcriptionnel. Ces paramètres ne peuvent pas rendre compte de l'inhibition de l'expression de *stx2* que nous avons nous-mêmes observée car le pH des milieux conditionnés est ajusté à 7 avant la culture de EDL 933. De plus, la concentration en acétate de ces milieux est de l'ordre de 30 mM.

Il a été récemment montré que les colicines DNases ou que la co-culture des souches EHEC avec des souches produisant des colicines augmentent la production de Stx2 en induisant la

réponse SOS (Toshima *et al.*, 2007). Mais le tractus intestinal humain est colonisé par environ 10^{14} bactéries commensales comprenant approximativement un millier d'espèces différentes parmi lesquelles les entérobactéries ne représentent que 0,2% des bactéries totales (Zoetendal *et al.*, 2006). Par conséquent, la réelle implication de ces colicines *in vivo*, sachant que les producteurs sont une minorité au sein de cette flore complexe, reste à démontrer. Certaines molécules du quorum sensing pourraient aussi influencer l'expression de gènes de virulence *in vivo*. Sperandio *et al.* ont montré que certaines bactéries fécales produisaient les autoinducteurs AI-2 et AI-3 impliqués dans le quorum sensing inter-espèces (Sperandio *et al.*, 2003). AI-2 est un furanosyl borate diester, et l'enzyme responsable de sa biosynthèse est codée par le gène *luxS* (Surette *et al.*, 1999). L'enzyme LuxS est aussi indirectement impliquée dans la biosynthèse de l'AI-3 (Walters *et al.*, 2006). AI-3 se fixe sur le senseur QseC, conduisant à l'activation de la transcription du régulon flagellaire responsable de la mobilité des EHEC (Clarke *et al.*, 2006; Clarke and Sperandio, 2005b). L'expression des gènes du locus d'effacement des entérocytes est aussi activée par le quorum sensing via le régulateur transcriptionnel QseA (Sperandio *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2007; Sharp and Sperandio, 2007). L'influence du quorum sensing dans la régulation de l'expression de *stx2* via LuxS est assez floue : une souche sauvage d'*E. coli* O157:H7 produit plus de Stx2 que son mutant isogénique *luxS* (Sperandio *et al.*, 2001; Jeon and Itoh, 2007). Il a été observé une plus forte transcription de *stx2* dans une souche sauvage que dans un mutant isogénique *luxS* lors d'une étude (Sperandio *et al.*, 2001), mais pas dans une autre plus récente, pourtant du même groupe (Kendall *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, l'addition d'AI-2 et AI-3 dans le milieu de culture du mutant *luxS* réprime l'expression de *stx2*. Dans les études utilisant des souris axéniques, il n'est pas apparu de différence entre la souche sauvage et le mutant *luxS* concernant le nombre de bactéries fécales, la production de Stx2 et la létalité des souris, ce qui indique que AI-2 et AI-3 ne contribuent pas de façon majeure à l'expression de Stx2 dans ce modèle *in vivo* (Jeon and Itoh, 2007). AI-2 et AI-3 ne sont vraisemblablement pas impliqués dans l'inhibition de la synthèse de Stx2 observée dans notre étude puisque l'inhibition est observée dans les mutants *qseA* et *qseC*. Ceci est appuyé par le fait que nous n'avons pas détecté d'AI-3 dans le milieu conditionné en utilisant la souche reportrice TEVS232. En revanche, ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus *in vitro* lors de l'étude de la production de Stx2 par le mutant EDL 933 Δ *qseA* en présence de MC où nous avons constaté que la mutation de ce gène réduisait la production de Stx2. Ceci signifie probablement que les voies de signalisation mises en jeu dans les 2 conditions sont différentes. Dans un milieu complexe comme le tube digestif, le régulateur QseA intervenant

lors de l'induction du système SOS n'est probablement pas sollicité. Ceci est corroboré par le fait que l'inhibition observée est due à une diminution de la réponse SOS comme en témoigne la régulation négative du gène *recA*. Dans ce cas le système SOS étant réprimé, l'absence de QseA reste silencieuse.

Les molécules eucaryotes présentes dans le tube digestif ont aussi une influence sur la production de Stx *in vitro*. Par exemple, nous avons montré récemment que le monoxyde d'azote, un radical libre produit lors de l'inflammation de la muqueuse intestinale, inhibe la transcription de *stx2* et la synthèse de Stx2 en inhibant la réponse SOS induite par des agents endommageant l'ADN (Gobert *et al.*, 2007). Cependant, la concentration de monoxyde d'azote dans les milieux conditionnés et les contenus cécaux de rats est trop faible (de l'ordre de 20 μ M) pour être responsable de l'inhibition de la synthèse de Stx2 dans ces milieux. L'influence des catécholamines du tube digestif, épinéphrine et norépinéphrine, sur la production de Stx2 est controversée. Le groupe de Sperandio a montré que la norépinéphrine pouvait se fixer à QseC et ainsi se substituer à l'AI-3 pour activer *in vitro* la transcription des gènes impliqués dans l'adhésion et la biosynthèse du flagelle, suggérant ainsi que la norépinéphrine, l'épinéphrine et l'AI-3 utilisaient la même voie de signalisation (Sperandio *et al.*, 2003; Walters and Sperandio, 2006; Clarke *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que la norépinéphrine augmentait la production de toxine Stx2 par les *E. coli* O157:H7 (Lyte *et al.*, 1996a; Lyte *et al.*, 1996b; Voigt *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente montre que l'épinéphrine diminue l'expression de *stx2* dans un mutant *luxS* (Kendall *et al.*, 2007), tandis qu'une étude en microarray sur des O157:H7 en biofilm ne montre pas de changement d'expression de *stx2* dû à l'ajout d'épinéphrine ou de norépinéphrine (Lee *et al.*, 2007a). L'implication de l'épinéphrine et de la norépinéphrine dans l'inhibition de la synthèse de Stx2 que nous avons observée est peu probable puisque nous avons obtenu ces résultats dans le milieu CC qui ne contient pas ces molécules. De plus, nous avons observé des quantités plus importantes d'ARNm *stx2* et de toxine dans les milieux de culture à base de contenu cécal de rats que dans les milieux CC. On peut donc envisager que les facteurs intestinaux provenant de l'hôte stimulent la production de toxine et que d'autres composés restant à identifier, produits directement ou indirectement à partir de composés déjà présents, suppriment cette activation et répriment la synthèse de Stx2. Les composés d'origine eucaryote ou procaryote, quand ils sont testés seuls dans un milieu de laboratoire, peuvent avoir un effet, mais cet effet n'est peut être pas visible quand ils sont présents en compagnie d'autres composés produits par le microbiote intestinal dans le milieu complexe qu'est le contenu intestinal.

En outre, nous avons montré que l'espèce *B. thetaiotaomicron*, fréquemment isolée à des niveaux de population élevés dans les flores fécales humaines, était capable à elle seule d'exercer une action inhibitrice. Le taux d'inhibition observé nous laisse cependant penser qu'elle n'est pas la seule responsable de l'inhibition de la production de Stx2 par le microbiote. Cette idée est appuyée par les résultats, bien que préliminaires, obtenus en mettant en interaction 2 ou 3 espèces bactériennes différentes qui montrent des effets additifs ou antagonistes de certaines espèces avec *B. thetaiotaomicron*. Quoiqu'il en soit, l'implication de cette espèce peut nous laisser penser que le mode d'alimentation des nouveau-nés pourrait avoir une influence sur leur susceptibilité aux infections par les EHEC. En effet, le genre *Bacteroides* est majoritaire chez les enfants nourris au lait maternisé mais pas chez les enfants nourris au sein chez lesquels le genre *Bifidobacterium* prédomine (Fuller, 1991; Harmsen *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous avons montré que dans un milieu probablement assez proche de notre contenu intestinal le microbiote humain exerce un contrôle négatif sur la production de toxine Stx2. Le microbiote intestinal d'individus sains, en plus de son effet antimicrobien déjà connu, possède donc aussi la capacité de réprimer l'expression de l'un des facteurs de virulence les plus importants des EHEC. En outre, des études *in vivo* dans des souris traitées à la streptomycine ont montré que les gènes *stx* pouvaient être transférés horizontalement par les phages *stx* à des souches *E. coli* sensibles aux phages qui par conséquent acquièrent la capacité à produire la toxine, et donc participeraient au développement des pathologies gravées liées aux EHEC (Gamage *et al.*, 2003; Gamage *et al.*, 2006). En inhibant la réponse SOS et donc l'induction lytique des phages *stx*, le microbiote des individus sains aurait un effet protecteur en réduisant la propagation des phages *stx* et la production de toxine dans le tube digestif. De plus, il a été décrit que Stx2 joue un rôle dans la colonisation de l'intestin en augmentant l'adhésion des EHEC aux entérocytes (Robinson *et al.*, 2006). Ainsi, on pourrait facilement supposer que les enfants dont le microbiote intestinal est quelque peu perturbé pourraient présenter une susceptibilité plus importante aux EHEC et donc auraient plus de risques de développer un SHU.

Au cours de nos études sur la production de Stx2 par la souche EDL 933, nous avons utilisé différents milieux de culture et nous avons remarqué quelques différences en termes de quantité de Stx2 libérée. En effet, les études réalisées en milieu M9 (le plus riche en glucose 4g/l) montrent que la production de toxine Stx2 est faible dans ce milieu (de l'ordre de 80 ng/ml à 24 h). La production dans les milieux LB, DMEM et CC (teneur en glucose de l'ordre de 0 à 1g/l) sont moyennes et de l'ordre de 300 ng/ml après 24 h de culture. En revanche, la

concentration de Stx2 après 24 h de culture dans le milieu à base de contenu cécal de rat axénique ([glucose] =2g/l) est très élevée (1200 ng/ml). Ceci suggère qu'en absence de bactéries intestinales, l'hôte libère des facteurs capables d'induire une forte production de Stx2. Cette production importante pourrait aussi être due à des composés apportés par l'alimentation, qui dans le cas d'un rat axénique ne seraient pas utilisés par les bactéries intestinales. Ces composés, normalement métabolisés par le microbiote dans un animal conventionnel, pourraient donc avoir un effet inducteur sur la production de toxine dans l'animal axénique. La concentration de Stx2 dans les milieux à base de contenu cécal de rats à flore humaine est plus faible que celle retrouvée dans les milieux LB et DMEM (environ 50 ng/ml pour les rats à flore humaine enfant). Ceci signifie probablement que, non seulement le microbiote empêche l'induction importante observée dans les rats axéniques, mais inhibe aussi la production basale de Stx2 par les EHEC. Ceci est confirmé par les résultats obtenus en milieu CC conditionnés comparés au milieu CC non conditionné ou les facteurs de l'hôte et de l'alimentation n'interviennent pas.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les souches *E. coli* qui constituent le pathovar des STEC sont génétiquement très hétérogènes, et présentent de grandes variations individuelles de leur pouvoir pathogène. Les études destinées à trouver des marqueurs potentiels du degré de pathogénicité des différentes souches STEC isolées dans le réservoir naturel ou en conditions physiopathologiques se sont uniquement attachées à trouver des marqueurs génomiques. Or, la production de toxines par les EHEC apparaît comme un élément clé dans la pathogénicité de ces souches. Il nous a donc paru intéressant dans un premier temps d'étudier cet aspect sur un nombre relativement important de souches, et en particulier sur des souches du sérotypage C. En effet, la pathogénicité des souches O157:H7, LEE positives, qui composent le sérotypage A, ne laisse aucun doute. Dans notre étude, ces souches nous ont servi de référence de souches pathogènes auxquelles comparer les souches du sérotypage C. Bien que les souches qui le constituent ne possèdent pas le LEE, le sérotypage C est très hétérogène par la variété de sérotypes et de combinaisons de gènes de virulence associés aux souches. Parmi celles-ci, certaines ont été fréquemment associées à des cas sporadiques de SHU ou à des épidémies de faible ampleur, en particulier des souches de sérotype O113:H21 et O91:H21, alors que d'autres ne semblent pas pathogènes pour l'Homme ou responsables de pathologies moins graves. Les souches de ce sérotypage sont fréquemment isolées du réservoir animal et de produits alimentaires. A l'heure actuelle, il est difficile de déterminer si un isolat représente réellement un risque sanitaire ou pas. L'obtention d'outils permettant de répondre à cette question permettra de mieux évaluer le risque associé à la consommation alimentaire. C'est dans cette optique que nous avons choisi d'analyser la synthèse de Stx2 par un panel de souches de sérotypage C représentatif des souches impliquées lors d'infections par les EHEC, et de la comparer avec celle de souches O157:H7.

Le développement d'outils nécessaires à l'analyse de la production de Stx2 et de la cytotoxicité des souches était primordial à l'avancée de mes travaux. Au laboratoire, le test ELISA permettant une quantification précise de la concentration de Stx2 dans les surnageants n'était pas encore au point. De plus, mes travaux ont permis la mise au point de la PCR en temps réel, ciblée sur les gènes *stx₂* et *stx₂*-apparentés, technique qui est largement utilisée au laboratoire depuis.

Les résultats obtenus dans la première partie de mon travail ont montré que les souches appartenant au sérotypage C pouvaient être divisées en 2 sous groupes. Le premier comprend des souches qui expriment le variant *stx₂* et qui produisent une grande quantité de Stx2, en particulier en conditions induites. Ces souches possèdent les mêmes caractéristiques

en termes de production de Stx2 que les souches de sérotypage A et sont donc potentiellement dangereuses pour la santé humaine. Le second groupe inclut des souches qui produisent peu de Stx2, surtout en absence d'induction du système SOS, et qui expriment souvent d'autres variants que *stx2*. Ces souches apparaissent comme peu dangereuses et sont majoritairement associées à des pathologies moins graves. Notre étude a de plus mis en exergue l'extrême hétérogénéité génétique des souches STEC. En effet, nos résultats montrent que certains variants *stx2* ne sont pas inductibles par la mitomycine C et ne sont probablement pas portés par des prophages. Lors de ma thèse, j'ai voulu étudier l'organisation génétique de ces variants non inductibles afin de comparer la structure du promoteur, des séquences régulatrices de ces gènes et des séquences environnantes avec celles du variant *stx2* afin de proposer des explications à nos observations. Malheureusement, ces séquences sont vraisemblablement très polymorphes, et nous n'avons pas réussi à amplifier l'ADN correspondant à partir des souches d'intérêt avec les différentes amorces que nous avons dessinées à partir des séquences accessibles dans les bases de données. Nous avons alors choisi de nous consacrer à d'autres aspects de la régulation de la production de Stx2. Cependant, cette étude mériterait d'être poursuivie. La séquence des variants *stx2* étant connue, il est possible de réaliser une marche sur le chromosome pour déterminer la séquence nucléotidique en amont et en aval. L'objectif de ces investigations serait de caractériser des séquences nucléotidiques spécifiques des gènes *stx2* peu ou pas exprimés, ou non inductibles, et ainsi d'obtenir des marqueurs moléculaires permettant de discriminer les souches non-O157 présentant un faible risque sanitaire de celles susceptibles de produire Stx2.

Dans la suite de mon travail, je me suis plus particulièrement intéressé aux facteurs environnementaux susceptibles de moduler la production de Stx2 d'une souche pathogène O157:H7 dans le tube digestif humain, EDL 933. En effet, la synthèse de Stx2 *in vivo* est critique dans le développement de la pathologie, mais paradoxalement peu d'études ont analysé les facteurs pouvant réguler cette production *in vivo*. Dans la seconde partie de ma thèse, je me suis donc intéressé à l'effet de molécules présentes dans le tube digestif et dont on sait qu'elles participent à l'induction de la réponse SOS ou à la régulation de l'expression d'autres facteurs de virulence chez *E. coli* O157:H7.

J'ai tout d'abord testé les polyamines qui ont été décrites comme nécessaires à l'activation du système SOS chez *E. coli* K12 et présentes en abondance dans le tube digestif. La spermine, qui est la polyamine biologiquement la plus active, n'a montré aucun effet sur la synthèse de Stx2. Un mutant invalidé pour les gènes *speB* et *speC*, décrit chez *E. coli* K12

comme déficient en polyamines, produit autant de Stx2 que la souche sauvage. Les polyamines ne semblent donc pas nécessaires à l'induction maximale de la réponse SOS chez EDL 933. Mais cette étude mériterait d'être approfondie par le dosage des polyamines endogènes chez la souche sauvage et le mutant dans différentes conditions de culture, et le cas échéant par la construction d'un nouveau mutant pour invalider d'autres voies potentielles de synthèse des polyamines. De plus, il serait intéressant d'analyser l'effet d'un cocktail de polyamines sur la production de Stx2 qui aurait peut-être un effet plus marqué que la spermine seule.

Je me suis également intéressé à l'impact de molécules et régulateurs du quorum sensing sur la production de Stx2. La norépinéphrine ne semble avoir aucun effet sur la production de toxine Stx2, et donc le système de quorum sensing AI-3/norépinéphrine/épinéphrine n'entre vraisemblablement pas en jeu dans la régulation de l'expression de *stx2*. De plus, la délétion de *luxS* n'a pas d'effet non plus, ce qui confirme que l'AI-3, et indique que l'AI-2 ne sont pas impliqués dans la synthèse de Stx2. La délétion de *sdiA*, dont le produit est un régulateur transcriptionnel répondant aux HSL ou à l'indole, n'a elle non plus aucun effet sur la synthèse de Stx2. Cependant, un nouveau système de quorum sensing pourrait être impliqué dans la synthèse de Stx2. En effet, un mutant dont le gène *qseA* est délété ne produit pas autant d'ARNm *stx2* et de toxine Stx2 que la souche sauvage lorsque le système SOS est induit par la MC. Or, QseA est un activateur transcriptionnel de l'expression du LEE en présence d'AI-3 ou d'épinéphrine. On peut imaginer que QseA soit capable de répondre à d'autres signaux pour permettre une induction maximale de la réponse SOS ou de l'expression des gènes phagiques. Il serait intéressant de caractériser en détail le mécanisme moléculaire par lequel QseA module la production de Stx2 en concert avec la réponse SOS. Il faudrait pour cela regarder par exemple si QseA module l'activité de RecA, ou interfère avec l'autoclivage de *c1*, ou encore se fixe sur l'ADN phagique, réduisant ainsi l'activité des promoteurs précoces ou tardifs. Une autre approche plus globale serait de comparer le transcriptome de la souche sauvage et du mutant $\Delta qseA$ en présence de MC afin de caractériser les voies de régulation impliquées.

Dans la troisième partie de ma thèse, j'ai souhaité étudier la production de Stx2 par EDL 933 dans un milieu se rapprochant le plus possible de celui rencontré *in vivo* par les EHEC. Pour cela, j'ai travaillé avec un modèle de rat à microbiote humain couramment utilisé au laboratoire par l'équipe Ecosystèmes digestifs. Ce modèle m'a permis de mettre au point une approche originale, en cultivant EDL 933 dans un milieu contenant à la fois les molécules

produites par l'hôte et apportées par l'alimentation, et les métabolites bactériens produits par le microbiote. Ainsi, j'ai montré que le microbiote humain, de par les métabolites qu'il produit ou transforme, inhibe la production de toxine Stx2, et que cette inhibition s'exerce au niveau transcriptionnel indépendamment de la concentration cellulaire de EDL 933. Il s'agit là d'un résultat très original car c'est la première fois qu'est mise en évidence une régulation transcriptionnelle d'un facteur de virulence par un métabolite soluble produit par le microbiote intestinal humain, et ce dans un milieu aussi complexe qu'un contenu caecal. C'était également un résultat inattendu, car nous pensions qu'EDL 933 serait soumis à différents stress dans ce milieu, en particulier à l'action de défensines ou de bactériocines, et que cela aurait pour conséquence une activation de la réponse SOS et donc une production élevée de Stx2. S'il semble en effet que le contenu caecal des rats axéniques soit inducteur de la production de Stx2, les métabolites produits par le microbiote humain surmontent cet effet et sont même capables de réduire la synthèse de Stx2 à un niveau très faible. Ce résultat a été confirmé dans un milieu semi-synthétique, dans lequel j'ai également montré que l'inhibition de la synthèse de Stx2 s'exerçait aussi en présence d'un inducteur de la réponse SOS en réprimant l'expression de *recA*. De plus, l'espèce bactérienne en grande partie responsable de cette inhibition a été caractérisée. Il reste par contre à caractériser le ou les composés inhibiteurs, dont la masse moléculaire est probablement inférieure à 3 kDa. Il faudra ensuite mettre en évidence le mécanisme de régulation impliqué. Ceci pourra se faire par des techniques classiques de biologie moléculaire, mais aussi par analyse du transcriptome de EDL 933 cultivé dans un contenu caecal de rats axéniques et de rats associés au microbiote humain. A plus long terme, ces études pourraient permettre de proposer un nouveau schéma préventif applicable *in vivo* capable de limiter les conséquences fâcheuses d'une infection par les EHEC.

En parallèle de mon projet de thèse, j'ai participé à une étude développée par une étudiante en thèse dans l'équipe, qui concernait l'influence du monoxyde d'azote (NO) sur la synthèse de Stx2.

Les cellules de la barrière épithéliale intestinale sont les premières au contact des bactéries entéro-pathogènes. En réponse aux produits bactériens, les cellules épithéliales développent un programme de défense non spécifique. Cette réponse immunitaire innée se caractérise notamment par la synthèse de molécules effectrices aux nombreuses propriétés biologiques dont le NO. NO est un radical libre qui peut endommager les bactéries et/ou induire des modifications transcriptionnelles via des senseurs de NO. NsrR est une protéine répresseur dont l'activité de fixation à l'ADN est supprimée en présence de NO.

La souche de référence EDL 933 a été cultivée en présence ou non d'un donneur chimique de NO, NOR-4. NO n'a pas modifié la survie des EHEC. En revanche, l'expression des ARNm de *stx* et la synthèse de phages *stx*, en condition basale ou induite par la MC, a été inhibée par NO. En conséquence, la concentration en Stx dans les surnageants de culture de la souche EDL 933 a été diminuée suite au traitement par NO. De façon concomitante, l'expression du gène *recA* a été inhibée par le traitement des bactéries par NO. Enfin, dans des co-cultures EHEC/entérocytes humains, il a été démontré que NO produit par des cellules activées par des cytokines inhibe également l'expression des ARNm de *stx*.

Puis le mécanisme moléculaire par lequel NO inhibe l'expression de *stx* a été recherché, en étudiant plus précisément l'implication du senseur de NO NsrR. Une souche invalidée pour le gène codant pour NsrR et la souche complémentée correspondante ont été créées. Le mutant *nsrR* produit spontanément moins de Stx que la souche sauvage en condition basale ou induite par la MC, et l'ajout de NO ne modifie pas l'expression de *stx*. La souche $\Delta nsrR$ complémentée se comporte comme la souche sauvage. Ainsi, la transcription de *stx* est inhibée lorsqu'on supprime la fixation de NsrR sur ses sites, soit par l'utilisation de NO soit par la délétion du gène. Ce résultat démontre que NsrR régule la réponse SOS bactérienne et donc la production de Stx.

Ces résultats démontrent pour la première fois que NO peut moduler la production de toxine par des bactéries pathogènes sans altérer leur viabilité. L'augmentation de la production de NO chez des patients infectés (donneurs de NO, traitement par l'arginine) pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter le développement des SHU.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abreu MT, Fukata M and Arditi M (2005) TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *J Immunol* **174**: pp 4453-60.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas L S, Arnold E T and Arditi M (2001) Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates With Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**: pp 1609-16.
- Acheson DW and Keusch G T (1994) The *Shigella* Paradigm and Colitis Due to Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Gut* **35**: pp 872-4.
- Acheson DWK, Reidl J, Zhang X, Keusch G T, Mekalanos J J and Waldor M K (1998) In Vivo Transduction With Shiga Toxin 1-Encoding Phage. *Infect. Immun.* **66**: pp 4496-8.
- Ackers ML, Mahon B E, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes P S, Bibb W F, Rice D H, Barrett T J, Hutwagner L, Griffin P M and Slutsker L (1998) An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Leaf Lettuce Consumption. *J Infect Dis* **177**: pp 1588-93.
- Aertsen A, Fester D and Michiels C W (2005) Induction of Shiga Toxin-Converting Prophage in *Escherichia coli* by High Hydrostatic Pressure. *Appl Environ Microbiol* **71**: pp 1155-62.
- Agin TS and Wolf M K (1997) Identification of a Family of Intimins Common to *Escherichia coli* Causing Attaching-Effacing Lesions in Rabbits, Humans, and Swine. *Infect Immun* **65**: pp 320-6.
- Ahmed SaMD (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central scotland, in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* pp 59-65, ASM Press, Washington DC.
- Ahmer BM (2004) Cell-to-Cell Signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **52**: pp 933-45.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K and Helander I M (2000) Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl Environ Microbiol* **66**: pp 2001-5.
- Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich A W, Kim K S, Schmidt M A and Karch H (2007) Hemolysin From Shiga Toxin-Negative *Escherichia coli* O26 Strains Injures Microvascular Endothelium. *Microbes and Infection* **9**: pp 282-90.
- Andreoli SP, Trachtman H, Acheson D W, Siegler R L and Obrig T G (2002) Hemolytic Uremic Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapy. *Pediatr Nephrol* **17**: pp 293-8.
- Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M and Mikelsaar M (2003) Characterization of Intestinal Lactobacilli As Putative Probiotic Candidates. *Journal of Applied Microbiology* **94**: pp 403-12.
- Aragon V, Chao K and Dreyfus L A (1997) Effect of Cytolethal Distending Toxin on F-Actin Assembly and Cell Division in Chinese Hamster Ovary Cells. *Infect Immun* **65**: pp 3774-80.
- Armstrong GL, Hollingsworth J and Morris J G Jr (1996) Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 As a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiol Rev* **18**: pp 29-51.

Arnold KW and Kaspar C W (1995) Starvation- and Stationary-Phase-Induced Acid Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **61**: pp 2037-9.

Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A and Takeda Y (2004) Probiotic Bifidobacteria Protect Mice From Lethal Infection With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **72**: pp 2240-7.

Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F and Servin A L (2006) In Vitro Antibacterial Activity of *Lactobacillus helveticus* Strain KS300 Against Diarrhoeagenic, Uropathogenic and Vaginosis-Associated Bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **101**: pp 647-54.

B

Barkocy-Gallagher GA, Arthur T M, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford S D, Wheeler T L and Koochmarai M (2003) Seasonal Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Including O157:H7 and Non-O157 Serotypes, and *Salmonella* in Commercial Beef Processing Plants. *J Food Prot* **66**: pp 1978-86.

Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read R J and Brunton J L (1999) The Identification of Three Biologically Relevant Globotriaosyl Ceramide Receptor Binding Sites on the Verotoxin 1 B Subunit. *Mol Microbiol* **32**: pp 953-60.

Belay T and Sonnenfeld G (2002) Differential Effects of Catecholamines on in Vitro Growth of Pathogenic Bacteria. *Life Sciences* **71**: pp 447-56.

Bell BP, Goldoft M, Griffin P M, Davis M A, Gordon D C, Tarr P I, Bartleson C A, Lewis J H, Barrett T J, Wells J G and et al (1994) A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From Hamburgers. The Washington Experience. *JAMA* **272**: pp 1349-53.

Bell BP, Griffin P M, Lozano P, Christie D L, Kobayashi J M and Tarr P I (1997) Predictors of Hemolytic Uremic Syndrome in Children During a Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *Pediatrics* **100**: pp 12-

Bell RG (1997) Distribution and Sources of Microbial Contamination on Beef Carcasses. *Journal of Applied Microbiology* **82**: pp 292-300.

Benno Y, Endo K, Mizutani T, Namba Y, Komori T and Mitsuoka T (1989) Comparison of Fecal Microflora of Elderly Persons in Rural and Urban Areas of Japan. *Appl Environ Microbiol* **55**: pp 1100-5.

Berin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan L J, Miyamoto Y and Kagnoff M F (2002) Role of EHEC O157:H7 Virulence Factors in the Activation of Intestinal Epithelial Cell NF-KappaB and MAP Kinase Pathways and the Upregulated Expression of Interleukin 8. *Cell Microbiol* **4**: pp 635-48.

Bernbom N, Norrung B, Saadbye P, Molbak L, Vogensen F K and Licht T R (2006) Comparison of Methods and Animal Models Commonly Used for Investigation of Fecal Microbiota: Effects of Time, Host and Gender. *J Microbiol Methods* **66**: pp 87-95.

Bernet MF, Brassart D, Neeser J R and Servin A L (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 Binds to Cultured Human Intestinal Cell Lines and Inhibits Cell Attachment and Cell Invasion by Enterovirulent Bacteria. 10.1136/Gut.35.4.483. *Gut* **35**: pp 483-89.

Berry ED and Cutter C N (2000) Effects of Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on Efficacy of Acetic Acid Spray Washes to Decontaminate Beef Carcass Tissue. *Appl Environ Microbiol* **66**: pp 1493-8.

Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V and Martin C (2001) Stx2 Subtyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle in France: Detection of a New Stx2 Subtype and Correlation With Additional Virulence Factors. *J Clin Microbiol* **39**: pp 3060-5.

Besser RE, Lett S M, Weber J T, Doyle M P, Barrett T J, Wells J G and Griffin P M (1993) An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. *JAMA* **269**: pp 2217-20.

Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K and Albrecht N (2007) Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* From Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: pp 4769-75.

Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt M A and Karch H (2004) Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups. *Infect Immun* **72**: pp 1812-6.

Bielaszewska M, Friedrich A W, Aldick T, Schurk-Bulgrin R and Karch H (2006) Shiga Toxin Activatable by Intestinal Mucus in *Escherichia coli* Isolated From Humans: Predictor for a Severe Clinical Outcome. *Clin Infect Dis* **43**: pp 1160-7.

Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T and Karch H (2005) Cytolethal Distending Toxin From Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Causes Irreversible G2/M Arrest, Inhibition of Proliferation, and Death of Human Endothelial Cells. *Infect Immun* **73**: pp 552-62.

Bjork S, Breimer M E, Hansson G C, Karlsson K A and Leffler H (1987) Structures of Blood Group Glycosphingolipids of Human Small Intestine. A Relation Between the Expression of Fucolipids of Epithelial Cells and the ABO, Le and Se Phenotype of the Donor. *J Biol Chem* **262**: pp 6758-65.

Blanco M, Blanco J E, Blanco J, Gonzalez E A, Mora A, Prado C, Fernandez L, Rio M, Ramos J and Alonso M P (1996) Prevalence and Characteristics of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Verotoxin-Producing *E. coli* in Healthy Cattle. *Epidemiol Infect* **117**: pp 251-7.

Blaut M, Collins M D, Welling G W, Dore J, van Loo J and de Vos W (2002) Molecular Biological Methods for Studying the Gut Microbiota: the EU Human Gut Flora Project. *Br J Nutr* **87 Suppl 2**: pp S203-11.

Boerlin P (1999-) Evolution of Virulence Factors in Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **56**: pp 735-741.

Boerlin P, Chen S, Colbourne J K, Johnson R, De Grandis S and Gyles C (1998) Evolution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin Plasmids and the Locus for Enterocyte Effacement in Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *Infect Immun* **66**: pp 2553-61.

Boukhors K, Pradel N, Girardeau J P, Livrelli V, Ou Said A M, Contrepolis M and Martin C (2002) Effect of Diet on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Growth and Survival in Rumen and Abomasum Fluids. *Vet Res* **33**: pp 405-12.

Boyd EF and Hartl D L (1998) Chromosomal Regions Specific to Pathogenic Isolates of *Escherichia coli* Have a Phylogenetically Clustered Distribution. *J Bacteriol* **180**: pp 1159-65.

Brewster DH, Brown M I, Robertson D, Houghton G L, Bimson J and Sharp J C (1994) An Outbreak of *Escherichia coli* O157 Associated With a Children's Paddling Pool. *Epidemiol Infect* **112**: pp 441-7.

Brigotti M, Caprioli A, Tozzi A E, Tazzari P L, Ricci F, Conte R, Carnicelli D, Procaccino M A, Minelli F, Ferretti A V S, Paglialonga F, Edefonti A and Rizzoni G (2006) Shiga Toxins Present in the Gut and in the Polymorphonuclear Leukocytes Circulating in the Blood of Children With Hemolytic-Uremic Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **44**: pp 313-7.

Brown CA, Harmon B G, Zhao T and Doyle M P (1997) Experimental *Escherichia coli* O157:H7 Carriage in Calves. *Appl Environ Microbiol* **63**: pp 27-32.

Brunder W, Schmidt H and Karch H (1997) EspP, a Novel Extracellular Serine Protease of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Cleaves Human Coagulation Factor V. *Mol Microbiol* **24**: pp 767-78.

Brunton J. Molecular Biology and role in disease of the verotoxins (Shiga-like toxins) of *Escherichia coli*. In *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis* V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy and R. R. Isberg (ed). ASM Press Washington DC, 391-404. 1994.

Buchanan RL and Edelson S G (1999) PH-Dependent Stationary-Phase Acid Resistance Response of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the Presence of Various Acidulants. *J Food Prot* **62**: pp 211-8.

Burk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bulte M and Martlbauer E (2003) Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of Bovine Origin. *J Clin Microbiol* **41**: pp 2106-12.

C

Calderwood SB and Mekalanos J J (1987) Iron Regulation of Shiga-Like Toxin Expression in *Escherichia coli* Is Mediated by the Fur Locus. *J. Bacteriol.* **169**: pp 4759-64.

Campellone KG, Robbins D and Leong J M (2004) EspFU Is a Translocated EHEC Effector That Interacts With Tir and N-WASP and Promotes Nck-Independent Actin Assembly. *Developmental Cell* **7**: pp 217-28.

Cario E, Gerken G and Podolsky D K (2004) Toll-Like Receptor 2 Enhances ZO-1-Associated Intestinal Epithelial Barrier Integrity Via Protein Kinase C. *Gastroenterology* **127**: pp 224-38.

Cash H. L. and Hooper L. V. (2005) Commensal Bacteria Shape Intestinal Immune System Development. *ASM News* **71**.

Cergole-Novella MC, Nishimura L S, dos Santos L F, Irino K, Vaz T M I, Bergamini A M M and Guth B E C (2007) Distribution of Virulence Profiles Related to New Toxins and Putative Adhesins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Diverse Sources in Brazil. *FEMS Microbiology Letters* **274**: pp 329-34.

Cergole-Novella MC, Nishimura L S, Irino K, Vaz T M I, de Castro A F P, Leomil L and Guth B E C (2006) Stx Genotypes and Antimicrobial Resistance Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated From Human Infections, Cattle and Foods in Brazil. *FEMS Microbiology Letters* **259**: pp 234-9.

Chattopadhyay MK, Tabor C W and Tabor H (2003) Polyamines Protect *Escherichia coli* Cells From the Toxic Effect of Oxygen. *PNAS* **100**: pp 2261-5.

Chauviere G, Coconnier M H, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B and Servin A L (1992) Competitive Exclusion of Diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) From Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells by Heat-Killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett* **70**: pp 213-7.

Chen , Xin, Schauder, Stephan, Potier, Noelle, Van Dorsselaer, Alain, Pelczer, Istvan, Bassler, Bonnie L., and Hughson, Frederick M (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**: pp 545-9.

Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z and Fang W (2007) The S-Layer Proteins of *Lactobacillus Crispatus* Strain ZJ001 Is Responsible for Competitive Exclusion Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* **115**: pp 307-312.

Cherla RP, Lee S-Y and Tesh V L (2003) Shiga Toxins and Apoptosis. *FEMS Microbiology Letters* **228**: pp 159-66.

Cheville AM, Arnold K W, Buchrieser C, Cheng C M and Kaspar C W (1996) RpoS Regulation of Acid, Heat, and Salt Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **62**: pp 1822-4.

Ching JC, Jones N L, Ceponis P J, Karmali M A and Sherman P M (2002) *Escherichia coli* Shiga-Like Toxins Induce Apoptosis and Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Via in Vitro Activation of Caspases. *Infect Immun* **70**: pp 4669-77.

Choi SH, Baumler D J and Kaspar C W (2000) Contribution of Dps to Acid Stress Tolerance and Oxidative Stress Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: pp 3911-3916.

Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G and Phillips A D (2007) Human Intestinal Tissue Tropism in *Escherichia coli* O157:H7 - Initial Colonization of Terminal Ileum and Peyer's Patches and Minimal Colonic Adhesion Ex Vivo. *Microbiology* **153**: pp 794-802.

Chopra P, Verma D, Khullar M, Sapru S and Mahmood S (2006-) Shiga Toxin Exposure Modulates Intestinal Brush Border Membrane Functional Proteins in Rabbit Ileum. *Molecular and Cellular Biochemistry* **283**: pp 85-92.

Clarke MB, Hughes D T, Zhu C, Boedeker E C and Sperandio V (2006) The QseC Sensor Kinase: A Bacterial Adrenergic Receptor. *PNAS* **103**: pp 10420-5.

Clarke MB and Sperandio V (2005a) Transcriptional Autoregulation by Quorum Sensing *Escherichia coli* Regulators B and C (QseBC) in Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *Molecular Microbiology* **58**: pp 441-55.

Clarke MB and Sperandio V (2005b) Transcriptional Regulation of FlhDC by QseBC and sigma (FlhA) in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **57**: pp 1734-49.

Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Renwick S, Rahn K, *et al.*, (1994) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain : preharvest and processing perspectives, in *Recent Advances in VTEC Infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing Escherichia coli Infections, Bergamo, Italy 27-30 June* pp 17-24, Elsevier Science.

Cleveland J, Montville T J, Nes I F and Chikindas M L (2001) Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Int J Food Microbiol* **71**: pp 1-20.

Cobbold R and Desmarchelier P (2002) Horizontal Transmission of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Within Groups of Dairy Calves. *Appl Environ Microbiol* **68**: pp 4148-52.

Cody SH, Glynn M K, Farrar J A, Cairns K L, Griffin P M, Kobayashi J, Fyfe M, Hoffman R, King A S, Lewis J H, Swaminathan B, Bryant R G and Vugia D J (1999) An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection From Unpasteurized Commercial Apple Juice. *Ann Intern Med* **130**: pp 202-9.

Conlan JW and Perry M B (1998) Susceptibility of Three Strains of Conventional Adult Mice to Intestinal Colonization by an Isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* **44**: pp 800-5.

Crane JK, McNamara B P and Donnenberg M S (2001) Role of EspF in Host Cell Death Induced by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: pp 197-211.

Cummings JH, Pomare E W, Branch W J, Naylor C P and Macfarlane G T (1987) Short Chain Fatty Acids in Human Large Intestine, Portal, Hepatic and Venous Blood. *Gut* **28**: pp 1221-7.

D

Datsenko KA and Wanner B L (2000) One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 6640-5.

De Kwaadsteniet M, Fraser T, Van Reenen C A and Dicks L M (2006) Bacteriocin T8, a Novel Class IIa Sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* T8, Isolated From Vaginal Secretions of Children Infected With Human Immunodeficiency Virus. *Appl Environ Microbiol* **72**: pp 4761-6.

Deng W, Puente J L, Gruenheid S, Li Y, Vallance B A, Vazquez A, Barba J, Ibarra J A, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T and Finlay B B (2004) Dissecting Virulence: Systematic and Functional Analyses of a Pathogenicity Island. *PNAS* **101**: pp 3597-602.

Donnenberg MS, Tzipori S, McKee M L, O'Brien A D, Alroy J and Kaper J B (1993) The Role of the Eae Gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment in Vitro and in a Porcine Model. *J Clin Invest* **92**: pp 1418-24.

Doré J. R-GL (2004) Méthode d'étude, in *Flore Microbienne Intestinale* pp 3-13, John Libbey Eurotext, Paris.

Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne R M and Hartland E L (2002) Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**: pp 6761-9.

Dowd, Scot E (2007). *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiology Letters* **273**: pp 214-23.

Downard J and Toal D (1995) Branched-Chain Fatty Acids: the Case for a Novel Form of Cell-Cell Signalling During *Myxococcus Xanthus* Development. *Mol Microbiol* **16**: pp 171-5.

E

Eberhard A, Burlingame A L, Eberhard C, Kenyon G L, Nealon K H and Oppenheimer N J (1981) Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium Fischeri* Luciferase. *Biochemistry* **20**: pp 2444-9.

Eckburg PB, Bik E M, Bernstein C N, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill S R, Nelson K E and Relman D A (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **308**: pp 1635-8.

Edwards CA and Parrett A M (2002) Intestinal Flora During the First Months of Life: New Perspectives. *Br J Nutr* **88 Suppl 1**: pp S11-8.

Elder RO, Keen J E, Siragusa G R, Barkocy-Gallagher G A, Koohmaraie M and Laegreid W W (2000) Correlation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Prevalence in Feces, Hides, and Carcasses of Beef Cattle During Processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: pp 2999-3003.

Elliott SJ, Sperandio V, Giron J A, Shin S, Mellies J L, Wainwright L, Hutcheson S W, McDaniel T K and Kaper J B (2000) The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**: pp 6115-26.

Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T and Igarashi K (1988) Site of Action of a Vero Toxin (VT2) From *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga Toxin on Eukaryotic Ribosomes. RNA N-Glycosidase Activity of the Toxins. *Eur J Biochem* **171**: pp 45-50.

Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguenec C and Denamur E (2004) A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**: pp 1085-94.

F

Farquhar D (2000) *E. coli*, Antibiotics and Hemolytic-Uremic Syndrome in Children. *CMAJ* **163**: pp 438.

Favier CF, Vaughan E E, De Vos W M and Akkermans A D (2002) Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Appl Environ Microbiol* **68**: pp 219-26.

Federle MJ and Bassler B L (2003) Interspecies Communication in Bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**: pp 1291-9.

Feng P, Lampel K A, Karch H and Whittam T S (1998) Genotypic and Phenotypic Changes in the Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* **177**: pp 1750-3.

Fernandez de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes J J, Ohmori H and Woodgate R (2000) Identification of Additional Genes Belonging to the LexA Regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **35**: pp 1560-72.

Finegold SM (1983) Proceedings of the North American Metronidazole Symposium. Anaerobic Infections. Scottsdale, Arizona, October 7-9, 1981. Introduction. *Surgery* **93**: pp 123-4.

Fitzhenry RJ, Stevens M P, Jenkins C, Wallis T S, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, Frankel G and Phillips A D (2003) Human Intestinal Tissue Tropism of Intimin Epsilon O103 *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **218**: pp 311-6.

Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter R S, Dillon M J and Barratt T M (1992) Interleukin-8 and Polymorphoneutrophil Leucocyte Activation in Hemolytic Uremic Syndrome of Childhood. *Kidney Int* **42**: pp 951-6.

Flagler MJ, Strasser J E, Chalk C L and Weiss A A (2007) Comparative Analysis of the Abilities of Shiga Toxins 1 and 2 To Bind to and Influence Neutrophil Apoptosis. *Infect. Immun.* **75**: pp 760-5.

Flourié B. FCEF (1988) Fonction Digestive Du Caecum Chez L'Homme Normal. *Cah. Nutr. Diet.* **23**: pp 111-5.

Frankel G, Candy D C, Fabiani E, Adu-Bobie J, Gil S, Novakova M, Phillips A D and Dougan G (1995) Molecular Characterization of a Carboxy-Terminal Eukaryotic-Cell-Binding Domain of Intimin From Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: pp 4323-8.

Franks AH, Harmsen H J, Raangs G C, Jansen G J, Schut F and Welling G W (1998) Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent in Situ Hybridization With Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol* **64**: pp 3336-45.

Fraser ME, Fujinaga M, Cherney M M, Melton-Celsa A R, Twiddy E M, O'Brien A D and James M N (2004) Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) From *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**: pp 27511-7.

Fratamico PM, Bagi L K, Bush E J and Solow B T (2004) Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. *Appl Environ Microbiol* **70**: pp 7173-8.

Freestone, Primrose P. E., Haigh, Richard D., and Lyte, Mark (2007). Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiology Letters* **269**: pp 221-8

Friedberg D, Umanski T, Fang Y and Rosenshine I (1999) Hierarchy in the Expression of the Locus of Enterocyte Effacement Genes of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **34**: pp 941-52.

Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W L, Pulz M, Kuczius T, Ammon A and Karch H (2002) *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association With Clinical Symptoms. *J Infect Dis* **185**: pp 74-84.

Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H and Karch H (2003) Shiga Toxin 1c-Producing *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Characterization and Association With Human Disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**: pp 2448-53.

Fuchs S, Muhldorfer I, Donohue-Rolfé A, Kerenyi M, Emody L, Alexiev R, Nenkov P and Hacker J (1999) Influence of RecA Onin Vivovirulence and Shiga Toxin 2 Production In *Escherichia coli* pathogens. *Microbial Pathogenesis* **27**: pp 13-23.

Fujii J, Matsui T, Heatherly D P, Schlegel K H, Lobo P I, Yutsudo T, Ciruolo G M, Morris R E and Obrig T (2003) Rapid Apoptosis Induced by Shiga Toxin in HeLa Cells. *Infect. Immun.* **71**: pp 2724-35.

Fuller R (1991) Probiotics in Human Medicine. *Gut* **32**: pp 439-42.

Fuller R. (1992) in *Probiotics : the Scientific Basis* Chapman & Hall, London.

G

Gamage SD, Patton A K, Strasser J E, Chalk C L and Weiss A A (2006) Commensal Bacteria Influence *Escherichia coli* O157:H7 Persistence and Shiga Toxin Production in the Mouse Intestine. *Infect Immun* **74**: pp 1977-83.

Gamage SD, Strasser J E, Chalk C L and Weiss A A (2003) Nonpathogenic *Escherichia coli* Can Contribute to the Production of Shiga Toxin. *Infect Immun* **71**: pp 3107-15.

Gamage SD, McGannon C M and Weiss A A (2004a) *Escherichia coli* Serogroup O107/O117 Lipopolysaccharide Binds and Neutralizes Shiga Toxin 2. *J. Bacteriol.* **186**: pp 5506-12.

Gamage SD, Patton A K, Hanson J F and Weiss A A (2004b) Diversity and Host Range of Shiga Toxin-Encoding Phage. *Infect. Immun.* **72**: pp 7131-39.

Gamage SD, Patton A K, Strasser J E, Chalk C L and Weiss A A (2006) Commensal Bacteria Influence *Escherichia coli* O157:H7 Persistence and Shiga Toxin Production in the Mouse Intestine. *Infect. Immun.* **74**: pp 1977-83.

Garmendia J, Frankel G and Crepin V F (2005) Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect. Immun.* **73**: pp 2573-85.

Garmendia J, Phillips A D, Carlier M-F, Chong Y, Schuller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw R K, Knutton S and Frankel G (2004) TccP Is an Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Type III Effector Protein That Couples Tir to the Actin-Cytoskeleton. *Cellular Microbiology* **6**: pp 1167-83.

Garred O, Dubinina E, Holm P K, Olsnes S, Van Deurs B, Kozlov J V and Sandvig K (1995) Role of Processing and Intracellular Transport for Optimal Toxicity of Shiga Toxin and Toxin Mutants. *Experimental Cell Research* **218**: pp 39-49.

Geelen JM, van der Velden T J A M, te Loo D M W M, Boerman O C, van den Heuvel L P W J and Monnens L A H (2007) Lack of Specific Binding of Shiga-Like Toxin (Verocytotoxin) and Non-Specific Interaction of Shiga-Like Toxin 2 Antibody With Human Polymorphonuclear Leucocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**: pp 749-55.

Gill SR, Pop M, DeBoy R T, Eckburg P B, Turnbaugh P J, Samuel B S, Gordon J I, Relman D A, Fraser-Liggett C M and Nelson K E (2006) Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* **312**: pp 1355-9.

Gillis S (1996) The Thrombocytopenic Purpuras. Recognition and Management. *Drugs* **51**: pp 942-53.

Girardeau JP, Dalmaso A, Bertin Y, Ducrot C, Bord S, Livrelli V, Vernozy-Rozand C and Martin C (2005) Association of Virulence Genotype With Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**: pp 6098-107.

Gobert AP, Wilson K T and Martin C (2005) Cellular Responses to Attaching and Effacing Bacteria: Activation and Implication of the Innate Immune System. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**: pp 234-44.

Gobert AP, Varelle M, Glasser A-L, Hindre T, de Sablet T and Martin C (2007) Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF- κ B Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* **178**: pp 8168-74.

Gobius KS, Higgs G M and Desmarchelier P M (2003) Presence of Activatable Shiga Toxin Genotype (Stx(2d)) in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* From Livestock Sources. *J Clin Microbiol* **41**: pp 3777-83.

Griffin PM (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, in *Infections of the Gastrointestinal Tract* pp 739-58, Raven Press, New York.

Griffin PM, Olmstead L C and Petras R E (1990) *Escherichia coli* O157:H7-Associated Colitis. A Clinical and Histological Study of 11 Cases. *Gastroenterology* **99**: pp 142-9.

Gruenheid S, Sekirov I, Thomas N A, Deng W, O'Donnell P, Goode D, Li Y, Frey E A, Brown N F, Metalnikov P, Pawson T, Ashman K and Finlay B B (2004) Identification and Characterization of NleA, a Non-LEE-Encoded Type III Translocated Virulence Factor of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **51**: pp 1233-49.

H

Haddad JE and Jackson M P (1993) Identification of the Shiga Toxin A-Subunit Residues Required for Holotoxin Assembly. *J Bacteriol* **175**: pp 7652-7.

Hancock DD, Besser T E, Kinsel M L, Tarr P I, Rice D H and Paros M G (1994) The Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy and Beef Cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* **113**: pp 199-207.

Hancock DD, Besser T E, Rice D H, Herriott D E and Tarr P I (1997) A Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157 in Fourteen Cattle Herds. *Epidemiol Infect* **118**: pp 193-5.

Hardie KR, Cooksley C, Green A D and Winzer K (2003) Autoinducer 2 Activity in *Escherichia coli* Culture Supernatants Can Be Actively Reduced Despite Maintenance of an Active Synthase, LuxS. *Microbiology* **149**: pp 715-28.

Harmon BG, Brown C A, Tkalcic S, Mueller P O, Parks A, Jain A V, Zhao T and Doyle M P (1999) Fecal Shedding and Rumen Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Fasted Calves. *J Food Prot* **62**: pp 574-9.

Harmsen HJ, Raangs G C, He T, Degener J E and Welling G W (2002) Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. *Appl Environ Microbiol* **68**: pp 2982-90.

Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo A C, Raangs G C, Wagendorp A A, Klijn N, Bindels J G and Welling G W (2000) Analysis of Intestinal Flora Development in Breast-Fed and Formula-Fed Infants by Using Molecular Identification and Detection Methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**: pp 61-7.

Harmsen H. J. M., Elfferich P., Schut F., and Welling G. W (1999). A 16S rRNA-targeted Probe for Detection of Lactobacilli and Enterococci in Faecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease* **11**: pp 3-12.

Harrison LM, Cherla R P, van den Hoogen C, van Haaften W C, Lee S Y and Tesh V L (2005) Comparative Evaluation of Apoptosis Induced by Shiga Toxin 1 and/or Lipopolysaccharides in Human Monocytic and Macrophage-Like Cells. *Microb Pathog* **38**: pp 63-76.

Hayashi H, Sakamoto M and Benno Y (2002) Phylogenetic Analysis of the Human Gut Microbiota Using 16S rDNA Clone Libraries and Strictly Anaerobic Culture-Based Methods. *Microbiol Immunol* **46**: pp 535-48.

Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han C G, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M and Shinagawa H (2001) Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison With a Laboratory Strain K-12. *DNA Res* **8**: pp 11-22.

Hold, Georgina L., Pryde, Susan E., Russell, Valerie J., Furrie, Elizabeth, and Flint, Harry J (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: pp 33-9.

Holdeman LV, Good I J and Moore W E (1976) Human Fecal Flora: Variation in Bacterial Composition Within Individuals and a Possible Effect of Emotional Stress. *Appl Environ Microbiol* **31**: pp 359-75.

Holgersson J, Jovall P A and Breimer M E (1991) Glycosphingolipids of Human Large Intestine: Detailed Structural Characterization With Special Reference to Blood Group Compounds and Bacterial Receptor Structures. *J Biochem (Tokyo)* **110**: pp 120-31.

Hooper LV, Stappenbeck T S, Hong C V and Gordon J I (2003) Angiogenins: a New Class of Microbicidal Proteins Involved in Innate Immunity. *Nat Immunol* **4**: pp 269-73.

Hooper LV, Wong M H, Thelin A, Hansson L, Falk P G and Gordon J I (2001) Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* **291**: pp 881-4.

Hungate RE (1969) A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobe., in *Methods in Microbiology* pp 117-132, Academic press, new York.

Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe C M, Lincicome L L, King A J, Keusch G T and Acheson D W (1999) Shiga Toxins 1 and 2 Translocate Differently Across Polarized Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun* **67**: pp 6670-7.

Hurley BP, Thorpe C M and Acheson D W K (2001) Shiga Toxin Translocation Across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration. *Infect. Immun.* **69**: pp 6148-6155.

Hussein HS (2007) Prevalence and Pathogenicity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef Cattle and Their Products. *J Anim Sci* **85**: pp 63-72.

Hussein HS and Bollinger L M (2005) Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef. *Meat Science* **71**: pp 676-89.

I

Inward CD, Varagunam M, Adu D, Milford D V and Taylor C M (1997) Cytokines in Haemolytic Uraemic Syndrome Associated With Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Infection. *Arch Dis Child* **77**: pp 145-7.

Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y and Nishibuchi M (1990) Cloning and Nucleotide Sequencing of Vero Toxin 2 Variant Genes From *Escherichia coli* O91:H21 Isolated From a Patient With the Hemolytic Uremic Syndrome. *Microb Pathog* **8**: pp 47-60.

Iyoda S and Watanabe H (2005) ClpXP Protease Controls Expression of the Type III Protein Secretion System Through Regulation of RpoS and GrlR Levels in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: pp 4086-94.

J

Janion C (2001) Some Aspects of the SOS Response System—a Critical Survey. *Acta Biochim Pol* **48**: pp 599-610.

Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt M A and Karch H (2003) Cytolethal Distending Toxin Gene Cluster in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and Evolutionary Considerations. *Infect. Immun.* **71**: pp 3634-8.

Jarvis KG and Kaper J B (1996) Secretion of Extracellular Proteins by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Via a Putative Type III Secretion System. *Infect Immun* **64**: pp 4826-9.

Jelacic JK, Damrow T, Chen G S, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho H M, Melton-Celsa A R, O'Brien A D and Tarr P I (2003) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial Genotypes and Clinical Profiles. *J Infect Dis* **188**: pp 719-29.

Jenkins C, Pearce M C, Chart H, Cheasty T, Willshaw G A, Gunn G J, Dougan G, Smith H R, Syngé B A and Frankel G (2002) An Eight-Month Study of a Population of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Scottish Cattle Herd. *Journal of Applied Microbiology* **93**: pp 944-53.

Jeon B and Itoh K (2007) Production of Shiga Toxin by a LuxS Mutant of *Escherichia coli* O157:H7 In Vivo and In Vitro. *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY* **57** : pp 391-6.

Johansen BK, Wasteson Y, Granum P E and Brynstad S (2001) Mosaic Structure of Shiga-Toxin-2-Encoding Phages Isolated From *Escherichia coli* O157:H7 Indicates Frequent Gene Exchange Between Lambdoid Phage Genomes. *Microbiology* **147**: pp 1929-36.

Johnson-Henry KC, Hagen K E, Gordonpour M, Tompkins T A and Sherman P M (2007) Surface-Layer Protein Extracts From *Lactobacillus Helveticus* Inhibit Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Adhesion to Epithelial Cells. *Cellular Microbiology* **9**: pp 356-67.

Johnson KE, Thorpe C M and Sears C L (2006) The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* . *Clin Infect Dis* **43**: pp 1587-95.

Jordan DM, Cornick N, Torres A G, Dean-Nystrom E A, Kaper J B and Moon H W (2004) Long Polar Fimbriae Contribute to Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 In Vivo. *Infect. Immun.* **72**: pp 6168-71.

K

Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T and Sasakawa C (2000) SdiA, an *Escherichia coli* Homologue of Quorum-Sensing Regulators, Controls the Expression of Virulence Factors in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* **38**: pp 805-16.

- Kaper JB and Sperandio V (2005) Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun.* **73**: pp 3197-209.
- Karch H. (1999) Origins of EHEC, in *Abstracts of the 2nd International Symposium of the European Study Group on EHEC*. pp 33, Acta Clinica Belgica, Brussels.
- Karch, Helge Ph. D., Friedrich, Alexander W. M. D., Gerber, Angela M. D., Zimmerhackl, Lothar B. M. D., Schmidt, M. Alexander Ph. D., and Bielaszewska, Martina M. D (2006). New Aspects in the Pathogenesis of Enteropathic Hemolytic Uremic Syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **32**: pp 105-12.
- Karmali MA (1989) Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**: pp 15-38.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming P C and Steele B T (1983a) *Escherichia coli* Cytotoxin, Haemolytic-Uraemic Syndrome, and Haemorrhagic Colitis. *Lancet* **2**: pp 1299-300.
- Karmali MA, Steele B T, Petric M and Lim C (1983b) Sporadic Cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome Associated With Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* in Stools. *Lancet* **1**: pp 619-20.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K and Kaper J B (2003) Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 With Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**: pp 4930-40.
- Kasman L (2005) Barriers to Coliphage Infection of Commensal Intestinal Flora of Laboratory Mice. *Virology Journal* **2**: pp 34.
- Kauffmann, F. The Serology of the *coli* Group (1947). *J Immunol* **57**: pp 71-100.
- Keene WE, Hedberg K, Herriott D E, Hancock D D, McKay R W, Barrett T J and Fleming D W (1997) A Prolonged Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Caused by Commercially Distributed Raw Milk. *J Infect Dis* **176**: pp 815-8.
- Kelly D, Campbell J I, King T P, Grant G, Jansson E A, Coutts A G, Pettersson S and Conway S (2004) Commensal Anaerobic Gut Bacteria Attenuate Inflammation by Regulating Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of PPAR-Gamma and RelA. *Nat Immunol* **5**: pp 104-12.
- Kelly D, Conway S and Aminov R (2005) Commensal Gut Bacteria: Mechanisms of Immune Modulation. *Trends in Immunology* **26**: pp 326-33.
- Kendall MM, Rasko D A and Sperandio V (2007) Global Effects of the Cell-to-Cell Signaling Molecules Autoinducer-2, Autoinducer-3, and Epinephrine in a LuxS Mutant of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75**: pp 4875-84.
- Kenny B and Jepson M (2000) Targeting of an Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Effector Protein to Host Mitochondria. *Cell Microbiol* **2**: pp 579-90.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid D J, Frey E A and Finlay B B (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell* **91**: pp 511-520.

Kim IG and Oh T J (2000) SOS Induction of the RecA Gene by UV-, Gamma-Irradiation and Mitomycin C Is Mediated by Polyamines in *Escherichia coli* K-12. *Toxicol Lett* **116**: pp 143-9.

Kim SK and Kaiser D (1990) C-Factor: A Cell-Cell Signaling Protein Required for Fruiting Body Morphogenesis of *M. Xanthus*. *Cell* **61**: pp 19-26.

Kimmit P, Harwood C and Barer M (2000) Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. *Emerging infectious disease* **6**: pp 458-65.

Kleerebezem M, Quadri L E N, Kuipers O P and de Vos W M (1997) Quorum Sensing by Peptide Pheromones and Two-Component Signal-Transduction Systems in Gram-Positive Bacteria. *Molecular Microbiology* **24**: pp 895-904.

Koch C, Hertwig S, Lurz R, Appel B and Beutin L (2001) Isolation of a Lysogenic Bacteriophage Carrying the Stx(1(OX3)) Gene, Which Is Closely Associated With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains From Sheep and Humans. *J Clin Microbiol* **39**: pp 3992-8.

Kodama T, Nagayama K, Yamada K, Ohba Y, Akeda Y and Honda T (1999-) Induction of Apoptosis in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells by *Escherichia coli* Verocytotoxin 1 in Vitro. *Medical Microbiology and Immunology* **188**: pp 73-78.

Kokai-Kun JF, Melton-Celsa A R and O'Brien A D (2000) Elastase in Intestinal Mucus Enhances the Cytotoxicity of Shiga Toxin Type 2d. *J Biol Chem* **275**: pp 3713-21.

Konowalchuk J, Speirs J I and Stavric S (1977) Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**: pp 775-9.

Kutsukake K, Ohya Y and Iino T (1990) Transcriptional Analysis of the Flagellar Regulon of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* **172**: pp 741-7.

L

Laaberki MH, Janabi N, Oswald E and Repoila F (2006) Concert of Regulators to Switch on LEE Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7: Interplay Between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *International Journal of Medical Microbiology* **296**: pp 197-210.

Lan A, Bruneau A, Philippe C, Rochet V, Rouault A, Hervé C, Roland N, Rabot S, Jan G (2007) Survival and Metabolic Activity of Selected Strains of *Propionibacterium freundenreichii* in the Gastrointestinal Tract of Human Microbiota-Associated Rats. *Br J Nutr.* **97**:pp 714-24

Lee J, Bansal T, Jayaraman A, Bentley W E and Wood T K (2007a) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Biofilms Are Inhibited by 7-Hydroxyindole and Stimulated by Isatin. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: pp 4100-9.

Lee J, Jayaraman A and Wood T (2007b) Indole Is an Inter-Species Biofilm Signal Mediated by SdiA. *BMC Microbiology* **7**: pp 42.

Lee Y-K, Puong K-Y, Ouwehand A C and Salminen S (2003) Displacement of Bacterial Pathogens From Mucus and Caco-2 Cell Surface by *Lactobacilli*. *J Med Microbiol* **52**: pp 925-30.

- Leedle JA and Hespell R B (1980) Differential Carbohydrate Media and Anaerobic Replica Plating Techniques in Delineating Carbohydrate-Utilizing Subgroups in Rumen Bacterial Populations. *Appl Environ Microbiol* **39**: pp 709-19.
- Levine MM (1987) *Escherichia coli* That Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: pp 377-89.
- Leyer GJ, Wang L L and Johnson E A (1995) Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 Increases Survival in Acidic Foods. *Appl Environ Microbiol* **61**: pp 3752-5.
- Li J, Wang L, Hashimoto Y, Tsao C Y, Wood T K, Valdes J J, Zafiriou E and Bentley W E (2006) A Stochastic Model of *Escherichia coli* AI-2 Quorum Signal Circuit Reveals Alternative Synthesis Pathways. *Mol Syst Biol* **2**: pp 67.
- Lievin-Le Moal V and Servin A L (2006) The Front Line of Enteric Host Defense Against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clin Microbiol Rev* **19**: pp 315-37.
- Lin J, Smith M, Chapin K, Baik H, Bennett G and Foster J (1996) Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: pp 3094-100.
- Lindgren SW, Melton A R and O'Brien A D (1993) Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 Clinical Isolates in an Orally Infected Mouse Model. *Infect Immun* **61**: pp 3832-42.
- Lindgren SW, Samuel J E, Schmitt C K and O'Brien A D (1994) The Specific Activities of Shiga-Like Toxin Type II (SLT-II) and SLT-II-Related Toxins of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Differ When Measured by Vero Cell Cytotoxicity but Not by Mouse Lethality. *Infect. Immun.* **62**: pp 623-31.
- Litalien C, Proulx F, Mariscalco M M, Robitaille P, Turgeon J P, Orrbine E, Rowe P C, McLaine P N and Seidman E (1999) Circulating Inflammatory Cytokine Levels in Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr Nephrol* **13**: pp 840-5.
- Liu J, Akahoshi T, Sasahana T, Kitasato H, Namai R, Sasaki T, Inoue M and Kondo H (1999) Inhibition of Neutrophil Apoptosis by Verotoxin 2 Derived From *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **67**: pp 6203-5.
- Livny J and Friedman D I (2004) Characterizing Spontaneous Induction of Stx Encoding Phages Using a Selectable Reporter System. *Mol Microbiol* **51**: pp 1691-704.
- Louise CB and Obrig T G (1995) Specific Interaction of *Escherichia coli* O157:H7-Derived Shiga-Like Toxin II With Human Renal Endothelial Cells. *J Infect Dis* **172**: pp 1397-401.
- Luck SN, Bennett-Wood V, Poon R, Robins-Browne R M and Hartland E L (2005) Invasion of Epithelial Cells by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**: pp 3063-71.
- Luo Y, Frey E A, Pfuetzner R A, Creagh A L, Knoechel D G, Haynes C A, Finlay B B and Strynadka N C (2000) Crystal Structure of Enteropathogenic *Escherichia coli* Intimin-Receptor Complex. *Nature* **405**: pp 1073-7.

Lyte M. and Ernst S. (1993) Alpha and Beta Adrenergic Receptor Involvement in Catecholamine-Induced Growth of Gram-Negative Bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**: pp 447-452.

Lyte M, Arulanandam B P and Frank C D (1996a) Production of Shiga-Like Toxins by *Escherichia coli* O157:H7 Can Be Influenced by the Neuroendocrine Hormone Norepinephrine. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70th Annual Meeting **128**: pp 392-8.

Lyte M, Frank C D and Green B T (1996b) Production of an Autoinducer of Growth by Norepinephrine Cultured *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiology Letters* **139**: pp 155-159.

M

Ma D, Forsythe P and Bienenstock J (2004) Live *Lactobacillus Reuteri* Is Essential for the Inhibitory Effect on Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-8 Expression. *Infect. Immun.* **72** : pp 5308-14.

MacFarlane GT and Cummings J H (1991) The colonic flora fermentation and large bowel digestive function, in *The Large Intestine : Physiology, Pathophysiology and Disease* (Phillips S. F., Penberton J.H., Shorter R.G. (eds) pp 51-91, Raven Press, New york.

Mackie RI, Sghir A and Gaskins H R (1999) Developmental Microbial Ecology of the Neonatal Gastrointestinal Tract. *Am J Clin Nutr* **69**: pp 1035S-45S.

Maki DG (2006) Don't Eat the Spinach—Controlling Foodborne Infectious Disease. *N Engl J Med* **355**: pp 1952-5.

Mannix M, O'Connell N, McNamara E, Fitzgerald A, Prendiville T, Norris T, Grealley T, Fitzgerald R, Whyte D, Barron D, Monaghan R, Whelan E, Carroll A, Curtin A, Collins C, Quinn J, O'Dea F, O'Riordan M, Buckley J, McCarthy J and Mc Keown P (2005) Large *E. coli* O157 Outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro Surveill* **10**: pp E051222-3.

Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A and Corthier G (2001) Comparative Study of Bacterial Groups Within the Human Cecal and Fecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol* **67**: pp 4939-42.

Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U and Matteuzzi D (2002) Characterization and Selection of Vaginal *Lactobacillus* Strains for the Preparation of Vaginal Tablets. *J Appl Microbiol* **93**: pp 884-93.

Masuda N and Church G M (2003) Regulatory Network of Acid Resistance Genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: pp 699-712.

Mates AK, Sayed A K and Foster J W (2007) Products of the *Escherichia coli* Acid Fitness Island Attenuate Metabolite Stress at Extremely Low PH and Mediate a Cell Density-Dependent Acid Resistance. *J Bacteriol* **189**: pp 2759-68.

Matsushiro A, Sato K, Miyamoto H, Yamamura T and Honda T (1999) Induction of Prophages of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 With Norfloxacin. *J Bacteriol* **181**: pp 2257-60.

McCormick B, Colgan S, Delp-Archer C, Miller S and Madara J (1993) *Salmonella* Typhimurium Attachment to Human Intestinal Epithelial Monolayers: Transcellular Signalling to Subepithelial Neutrophils. *J. Cell Biol.* **123**: pp 895-907.

McCormick BA, Siber A M and Maurelli A T (1998) Requirement of the *Shigella Flexneri* Virulence Plasmid in the Ability To Induce Trafficking of Neutrophils Across Polarized Monolayers of the Intestinal Epithelium. *Infect. Immun.* **66**: pp 4237-43.

McEvoy JM, Doherty A M, Finnerty M, Sheridan J J, McGuire L, Blair I S, McDowell D A and Harrington D (2000) The Relationship Between Hide Cleanliness and Bacterial Numbers on Beef Carcasses at a Commercial Abattoir. *Letters in Applied Microbiology* **30**: pp 390-95.

McKee ML, Melton-Celsa A R, Moxley R A, Francis D H and O'Brien A D (1995) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin to Colonize the Gnotobiotic Pig Intestine and to Adhere to HEP-2 Cells. *Infect Immun* **63**: pp 3739-44.

Medellin-Pena MJ, Wang H, Johnson R, Anand S and Griffiths M W (2007) Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol* **73**: pp 4259-67.

Mellies JL, Haack K R and Galligan D C (2007) SOS Regulation of the Type III Secretion System of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: pp 2863-72.

Melmed G, Thomas L S, Lee N, Tesfay S Y, Lukasek K, Michelsen K S, Zhou Y, Hu B, Arditi M and Abreu M T (2003) Human Intestinal Epithelial Cells Are Broadly Unresponsive to Toll-Like Receptor 2-Dependent Bacterial Ligands: Implications for Host-Microbial Interactions in the Gut. *J Immunol* **170**: pp 1406-15.

Melton-Celsa AR, Kokai-Kun J F and O'Brien A D (2002) Activation of Shiga Toxin Type 2d (Stx2d) by Elastase Involves Cleavage of the C-Terminal Two Amino Acids of the A2 Peptide in the Context of the Appropriate B Pentamer. *Mol Microbiol* **43**: pp 207-15.

Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A and Yanagawa H (1999) Massive Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Schoolchildren in Sakai City, Japan, Associated With Consumption of White Radish Sprouts. *Am J Epidemiol* **150**: pp 787-96.

Milovic V and Turchanowa L (2003) Polyamines and Colon Cancer. *Biochem Soc Trans* **31**: pp 381-3.

Montenegro MA, Bulte M, Trumpf T, Aleksic S, Reuter G, Bulling E and Helmuth R (1990) Detection and Characterization of Fecal Verotoxin-Producing *Escherichia coli* From Healthy Cattle. *J Clin Microbiol* **28**: pp 1417-21.

Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, Watanabe M, Nomura F, Moss J and Noda M (2007) Two Distinct Cytotoxic Activities of Subtilase Cytotoxin Produced by Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75** : pp 488-96.

Mountzouris KC, McCartney A L and Gibson G R (2002) Intestinal Microflora of Human Infants and Current Trends for Its Nutritional Modulation. *Br J Nutr* **87**: pp 405-20.

Mowat AM (2003) Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens. *Nat Rev Immunol* **3**: pp 331-41.

Muniesa M and Jofre J (1998) Abundance in Sewage of Bacteriophages That Infect *Escherichia coli* O157:H7 and That Carry the Shiga Toxin 2 Gene. *Appl Environ Microbiol* **64**: pp 2443-8.

Muniesa M, Lucena F and Jofre J (1999) Comparative Survival of Free Shiga Toxin 2-Encoding Phages and *Escherichia coli* Strains Outside the Gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: pp 5615-8.

Muniesa M, Recktenwald J, Bielaszewska M, Karch H and Schmidt H (2000) Characterization of a Shiga Toxin 2e-Converting Bacteriophage From an *Escherichia coli* Strain of Human Origin. *Infect Immun* **68**: pp 4850-5.

Muniesa M, Serra-Moreno R and Jofre J (2004a) Free Shiga Toxin Bacteriophages Isolated From Sewage Showed Diversity Although the Stx Genes Appeared Conserved. *Environmental Microbiology* **6**: pp 716-25.

Muniesa M, Blanco J E, de Simon M, Serra-Moreno R, Blanch A R and Jofre J (2004b) Diversity of Stx2 Converting Bacteriophages Induced From Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated From Cattle. *Microbiology* **150**: pp 2959-71.

Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Panella H and Jofre J (2003) Shiga Toxin 2-Converting Bacteriophages Associated With Clonal Variability in *Escherichia coli* O157:H7 Strains of Human Origin Isolated From a Single Outbreak. *Infect. Immun.* **71**: pp 4554-62.

Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N and Okada S (1998) Profiles of Circulating Inflammatory- and Anti-Inflammatory Cytokines in Patients With Hemolytic Uremic Syndrome Due to *E. coli* O157 Infection. *Cytokine* **10**: pp 544-8.

N

Nealson, Kenneth H., Platt, Terry, and Hastings, J. Woodland. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **104**: pp 313-22.

Neish AS, Gewirtz A T, Zeng H, Young A N, Hobert M E, Karmali V, Rao A S and Madara J L (2000) Prokaryotic Regulation of Epithelial Responses by Inhibition of Ikappa B-Alpha Ubiquitination. *Science* **289**: pp 1560-1563.

Nes IF, Diep D B and Holo H (2007) Bacteriocin Diversity in *Streptococcus and Enterococcus*. *J Bacteriol* **189**: pp 1189-98.

Nicholls L, Grant T H and Robins-Browne R M (2000) Identification of a Novel Genetic Locus That Is Required for in Vitro Adhesion of a Clinical Isolate of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to Epithelial Cells. *Mol Microbiol* **35**: pp 275-88.

Nivet, H, Cloarec, S, and Benoit, S (1995). Syndrome hémolytique et urémique: rôle des Vérotoxines, épidémiologie prévention. *Rev. Med. Tours* **29**: pp 283-84.

Noack J, Dongowski G, Hartmann L and Blaut M (2000) The Human Gut Bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium* Produce Putrescine and Spermidine in Cecum of Pectin-Fed Gnotobiotic Rats. *J. Nutr.* **130**: pp 1225-31.

Noack J, Kleessen B, Proll J, Dongowski G and Blaut M (1998) Dietary Guar Gum and Pectin Stimulate Intestinal Microbial Polyamine Synthesis in Rats. *J. Nutr.* **128**: pp 1385-91.

O

O'Brien AD and Holmes R K (1987) Shiga and Shiga-Like Toxins. *Microbiol Rev* **51**: pp 206-20.

- O'Brien AD, LaVeck G D, Thompson M R and Formal S B (1982) Production of *Shigella dysenteriae* Type 1-Like Cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**: pp 763-9.
- O'Brien A, Newland J, Miller S, Holmes R, Smith H and Formal S (1984) Shiga-Like Toxin-Converting Phages From *Escherichia coli* Strains That Cause Hemorrhagic Colitis or Infantile Diarrhea. *Science* **226**: pp 694-6.
- O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L and Shanahan F (2006) Functional Modulation of Human Intestinal Epithelial Cell Responses by *Bifidobacterium Infantis* and *Lactobacillus Salivarius*. *Immunology* **118**: pp 202-15.
- O'Loughlin EV and Robins-Browne R M (2001) Effect of Shiga Toxin and Shiga-Like Toxins on Eukaryotic Cells. *Microbes Infect* **3**: pp 493-507.
- Ochman H and Selander R K (1984) Standard Reference Strains of *Escherichia coli* From Natural Populations. *J. Bacteriol.* **157**: pp 690-3.
- Oelschlaeger TA, Barrett T J and Kopecko D J (1994) Some Structures and Processes of Human Epithelial Cells Involved in Uptake of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strains. *Infect Immun* **62**: pp 5142-50.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Takahashi M, Watanuki M, Tanaka R, Tanaka T, Hamabata T, Yamasaki S and Takeda Y (2001a) Protective Effect of *Lactobacillus Casei* Strain Shirota on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Infant Rabbits. *Infect. Immun.* **69**: pp 1101-08.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T and Takeda Y (2001b) Inhibition of in Vitro Growth of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 by Probiotic *Lactobacillus* Strains Due to Production of Lactic Acid. *International Journal of Food Microbiology* **68**: pp 135-40.
- Ogden ID, MacRae M and Strachan N J C (2004) Is the Prevalence and Shedding Concentrations of *E. coli* O157 in Beef Cattle in Scotland Seasonal? *FEMS Microbiology Letters* **233**: pp 297-300.
- Oh TJ and Kim I G (1999) The Expression of *Escherichia coli* SOS Genes RecA and UvrA Is Inducible by Polyamines. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: pp 584-9.
- Oku Y, Yutsudo T, Hirayama T, O'Brien A D and Takeda Y (1989) Purification and Some Properties of a Vero Toxin From a Human Strain of *Escherichia coli* That Is Immunologically Related to Shiga-Like Toxin II (VT2). *Microbial Pathogenesis* **6**: pp 113-22.
- Omisakin F, MacRae M, Ogden I D and Strachan N J C (2003) Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: pp 2444-7.
- Osset J, Bartolome R M, Garcia E and Andreu A (2001) Assessment of the Capacity of *Lactobacillus* to Inhibit the Growth of Uropathogens and Block Their Adhesion to Vaginal Epithelial Cells. *J Infect Dis* **183**: pp 485-91.
- Ostroff SM, Tarr P I, Neill M A, Lewis J H, Hargrett-Bean N and Kobayashi J M (1989) Toxin Genotypes and Plasmid Profiles As Determinants of Systemic Sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *J Infect Dis* **160**: pp 994-8.

Otte J-M, Cario E and Podolsky D K (2004) Mechanisms of Cross Hyporesponsiveness to Toll-Like Receptor Bacterial Ligands in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* **126**: pp 1054-70.

P

Pai CH, Kelly J K and Meyers G L (1986) Experimental Infection of Infant Rabbits With Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **51**: pp 16-23.

Paton AW, Morona R and Paton J C (2000) A New Biological Agent for Treatment of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Infections and Dysentery in Humans. *Nat Med* **6**: pp 265-70.

Paton AW, Paton J C, Goldwater P N, Heuzenroeder M W and Manning P A (1993) Sequence of a Variant Shiga-Like Toxin Type-I Operon of *Escherichia coli* O111:H-. *Gene* **129**: pp 87-92.

Paton AW, Beutin L and Paton J C (1995a) Heterogeneity of the Amino-Acid Sequences of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Type-I Operons. *Gene* **153**: pp 71-4.

Paton, AW., Manning, PA., and Paton, JC (1995) Increased oral virulence of *Escherichia coli* expressing a variant Shiga-like toxin type II operon is associated with both A subunit residues Met4 and Gly102. *Microbial Pathogenesis* **19**: pp 185-91.

Paton AW, Sriramanote P, Talbot U M, Wang H and Paton J C (2004) A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* **200**: pp 35-46.

Paton AW, Sriramanote P, Woodrow M C and Paton J C (2001) Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. *Infect. Immun.* **69**: pp 6999-7009.

Paton AW, Bourne A, Manning P and Paton JC (1995) Comparative Toxicity and Virulence of *Escherichia coli* Clones Expressing Variant and Chimeric Shiga-Like Toxin Type II Operons. *Infect. Immun.* **63**: pp 2450-2458.

Pellett S and Welch R A (1996) *Escherichia coli* Hemolysin Mutants With Altered Target Cell Specificity. *Infect Immun* **64**: pp 3081-7.

Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner J D, Rose D J, Mayhew G F, Evans P S, Gregor J, Kirkpatrick H A, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck E J, Davis N W, Lim A, Dimalanta E T, Potamousis K D, Apodaca J, Anantharaman T S, Lin J, Yen G, Schwartz D C, Welch R A and Blattner F R (2001) Genome Sequence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: pp 529-33.

Philpott DJ, Ackerley C A, Kiliaan A J, Karmali M A, Perdue M H and Sherman P M (1997) Translocation of Verotoxin-1 Across T84 Monolayers: Mechanism of Bacterial Toxin Penetration of Epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **273**: pp 1349-58.

Piddock LJ, Walters R N and Diver J M (1990) Correlation of Quinolone MIC and Inhibition of DNA, RNA, and Protein Synthesis and Induction of the SOS Response in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: pp 2331-6.

Pierard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D and Lauwers S (1998) Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiol* **36**: pp 3317-22.

Plunkett G 3rd, Rose D J, Durfee T J and Blattner F R (1999) Sequence of Shiga Toxin 2 Phage 933W From *Escherichia coli* O157:H7: Shiga Toxin As a Phage Late-Gene Product. *J Bacteriol* **181**: pp 1767-78.

Posse B, De Zutter L, Heyndrickx M and Herman L (2007) Metabolic and Genetic Profiling of Clinical O157 and Non-O157 Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **158**: pp 591-9.

Pradel N. *Escherichia coli* producteurs de Shiga toxines: étude épidémiologique, recherche des caractéristiques des souches pathogènes par comparaison moléculaire et hybridation soustractive. Thèse d'université. Université d'Auvergne. 2001.

Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux J B, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B and Forestier C (2000) Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle, Food, and Children During a One-Year Prospective Study in France. *J Clin Microbiol* **38**: pp 1023-31.

Price SB, Cheng C-M, Kaspar C W, Wright J C, DeGraves F J, Penfound T A, Castanie-Cornet M-P and Foster J W (2000) Role of RpoS in Acid Resistance and Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: pp 632-7.

Proulx F, Turgeon J P, Litalien C, Mariscalco M M, Robitaille P and Seidman E (1998) Inflammatory Mediators in *Escherichia coli* O157:H7 Hemorrhagic Colitis and Hemolytic-Uremic Syndrome. *Pediatr Infect Dis J* **17**: pp 899-904.

Pudymaitis A, Armstrong G and Lingwood C A (1991) Verotoxin-Resistant Cell Clones Are Deficient in the Glycolipid Globotriosylceramide: Differential Basis of Phenotype. *Arch Biochem Biophys* **286**: pp 448-52.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S and Medzhitov R (2004) Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* **118**: pp 229-41.

Rangel JM, Sparling P H, Crowe C, Griffin P M and Swerdlow D L (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* **11**: pp 603-9.

R

Reading NC, Torres A G, Kendall M M, Hughes D T, Yamamoto K and Sperandio V (2007) A Novel Two-Component Signaling System That Activates Transcription of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Effector Involved in Remodeling of Host Actin. *J. Bacteriol.* **189**: pp 2468-76.

Reid G, Tieszer C and Lam D (1995) Influence of Lactobacilli on the Adhesion of *Staphylococcus Aureus* and *Candida Albicans* to Fibers and Epithelial Cells. *J Ind Microbiol* **15**: pp 248-53.

Reid SD, Herbelin C J, Bumbaugh A C, Selander R K and Whittam T S (2000) Parallel Evolution of Virulence in Pathogenic *Escherichia coli*. **406**: pp 64-67.

Rietra PJ, Willshaw G A, Smith H R, Field A M, Scotland S M and Rowe B (1989) Comparison of Verocytotoxin-Encoding Phages From *Escherichia coli* of Human and Bovine Origin. *J Gen Microbiol* **135**: pp 2307-18.

Riordan DC, Duffy G, Sheridan J J, Whiting R C, Blair I S and McDowell D A (2000) Effects of Acid Adaptation, Product PH, and Heating on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Pepperoni. *Appl Environ Microbiol* **66**: pp 1726-9.

Ritchie JM, Wagner P L, Acheson D W and Waldor M K (2003) Comparison of Shiga Toxin Production by Hemolytic-Uremic Syndrome-Associated and Bovine-Associated Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol* **69**: pp 1059-66.

Robinson CM, Sinclair J F, Smith M J and O'Brien A D (2006) Shiga Toxin of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Type O157:H7 Promotes Intestinal Colonization. *PNAS* **103**: pp 9667-72.

Rogers TJ, Paton A W, McColl S R and Paton J C (2003) Enhanced CXC Chemokine Responses of Human Colonic Epithelial Cells to Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **71**: pp 5623-32.

Romain N, Dandrifosse G, Jeusette F and Forget P (1992) Polyamine Concentration in Rat Milk and Food, Human Milk, and Infant Formulas. *Pediatr Res* **32**: pp 58-63.

Russell RM, Sharp F C, Rasko D A and Sperandio V (2007) QseA and GrlR/GrlA Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Genes in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: pp 5387-92.

S

Said HM and Mohammed Z M (2006) Intestinal Absorption of Water-Soluble Vitamins: an Update. *Curr Opin Gastroenterol* **22**: pp 140-6.

Salyers AA, Kuritza A P and McCarthy R E (1985) Influence of Dietary Fiber on the Intestinal Environment. *Proc Soc Exp Biol Med* **180**: pp 415-21.

Sandvig K and van Deurs B (1996) Endocytosis, Intracellular Transport, and Cytotoxic Action of Shiga Toxin and Ricin. *Physiol Rev* **76**: pp 949-66.

Satokari RM, Vaughan E E, Akkermans A D, Saarela M and de Vos W M (2001) Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: pp 504-13.

Saunier K and Dore J (2002) Gastrointestinal Tract and the Elderly: Functional Foods, Gut Microflora and Healthy Ageing. *Dig Liver Dis* **34 Suppl 2**: pp S19-24.

Savkovic S, Koutsouris A and Hecht G (1996) Attachment of a Noninvasive Enteric Pathogen, Enteropathogenic *Escherichia coli*, to Cultured Human Intestinal Epithelial Monolayers Induces Transmigration of Neutrophils. *Infect. Immun.* **64**: pp 4480-7.

Schauder S, Shokat K, Surette M G and Bassler B L (2001) The LuxS Family of Bacterial Autoinducers: Biosynthesis of a Novel Quorum-Sensing Signal Molecule. *Molecular Microbiology* **41**: pp 463-76.

Schmidt H, Beutin L and Karch H (1995) Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: pp 1055-61.

- Schmidt H, Karch H and Beutin L (1994) The Large-Sized Plasmids of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains Encode Hemolysins Which Are Presumably Members of the *E. coli* Alpha-Hemolysin Family. *FEMS Microbiol Lett* **117**: pp 189-96.
- Schmidt H, Maier E, Karch H and Benz R (1996) Pore-Forming Properties of the Plasmid-Encoded Hemolysin of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem* **241**: pp 594-601.
- Schmidt H (2001) Shiga-Toxin-Converting Bacteriophages. *Research in Microbiology* **152**: pp 687-95.
- Schmitt CK, McKee M L and O'Brien A D (1991) Two Copies of Shiga-Like Toxin II-Related Genes Common in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Are Responsible for the Antigenic Heterogeneity of the O157:H- Strain E32511. *Infect Immun* **59**: pp 1065-73.
- Schoonmaker DJ, Tran C A, Dumas N B, Root T P, Davignon A, Sauders B D, Kelly M, Ackelsberg J, Drabkin P, Braun-Howland E, Dziewulski D, Endres H, Auer P and Muenoff P (2000) A large outbreak of water-borne *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with a country fair: Multiple pulsed field electrophoresis (PFGE) DNA fingerprint types among isolates from patients and environmental samples, in *Abstracts. 100th General Meeting* pp 159, ASM Press, Washington DC.
- Schuller S, Frankel G and Phillips A D (2004) Interaction of Shiga Toxin From *Escherichia coli* With Human Intestinal Epithelial Cell Lines and Explants: Stx2 Induces Epithelial Damage in Organ Culture. *Cellular Microbiology* **6**: pp 289-301.
- Scotland SM, Smith H R, Willshaw G A and Rowe B (1983) Vero Cytotoxin Production in Strain of *Escherichia coli* Is Determined by Genes Carried on Bacteriophage. *Lancet* **2**: pp 216.
- Servin AL (2004) Antagonistic Activities of Lactobacilli and Bifidobacteria Against Microbial Pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: pp 405-40.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P and Dore J (2000) Quantification of Bacterial Groups Within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**: pp 2263-6.
- Sharma VK and Zuerner R L (2004) Role of Hha and Ler in Transcriptional Regulation of the Esp Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **186**: pp 7290-7301.
- Sharp FC and Sperandio V (2007) QseA Directly Activates Transcription of LEE1 in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75**: pp 2432-40.
- Sherman PM and Soni R (1988) Adherence of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* of Serotype O157:H7 to Human Epithelial Cells in Tissue Culture: Role of Outer Membranes As Bacterial Adhesins. *J Med Microbiol* **26**: pp 11-7.
- Shu Q and Gill H S (2002) Immune Protection Mediated by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) Against *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Mice *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **34**: pp 59-64.
- Slutsker L, Ries A A, Greene K D, Wells J G, Hutwagner L and Griffin P M (1997) *Escherichia coli* O157:H7 Diarrhea in the United States: Clinical and Epidemiologic Features. *Ann Intern Med* **126**: pp 505-13.

- Silva M, Jacobus N V, Deneke C, Gorbach S L (1987) Antimicrobial substances from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:pp 1231-3.
- Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E and Slonczewski J L (1994) Acid and Base Resistance in *Escherichia coli* and Shigella Flexneri: Role of RpoS and Growth PH. *J Bacteriol* **176**: pp 1729-37.
- Soderstrom A, Lindberg A and Andersson Y (2005) EHEC O157 Outbreak in Sweden From Locally Produced Lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill* **10**: pp E050922.1.
- Soloaga A, Veiga M P, Garcia-Segura L M, Ostolaza H, Brasseur R and Goni F M (1999) Insertion of *Escherichia coli* Hly_{EHEC}-Haemolysin in Lipid Bilayers As a Non-Transmembrane Integral Protein: Prediction and Experiment. *Molecular Microbiology* **31**: pp 1013-24.
- Sonntag AK, Zenner E, Karch H and Bielaszewska M (2005) Pigeons As a Possible Reservoir of Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia coli* Pathogenic to Humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **118**: pp 464-70.
- Sperandio V, Kaper J B, Bortolini M R, Neves B C, Keller R and Trabulsi L R (1998) Characterization of the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) in Different Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) Serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**: pp 133-9.
- Sperandio V, Li C C and Kaper J B (2002) Quorum-Sensing *Escherichia coli* Regulator A: a Regulator of the LysR Family Involved in the Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island in Enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect. Immun.* **70**: pp 3085-93.
- Sperandio V, Mellies J L, Nguyen W, Shin S and Kaper J B (1999) Quorum Sensing Controls Expression of the Type III Secretion Gene Transcription and Protein Secretion in Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS* **96**: pp 15196-201.
- Sperandio V, Torres A G, Giron J A and Kaper J B (2001) Quorum Sensing Is a Global Regulatory Mechanism in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **183**: pp 5187-97.
- Sperandio V, Torres A G, Jarvis B, Nataro J P and Kaper J B (2003) Bacteria-Host Communication: The Language of Hormones. *PNAS* **100**: pp 8951-56.
- Sperandio V, Torres A G and Kaper J B (2002) Quorum Sensing *Escherichia coli* Regulators B and C (QseBC): a Novel Two-Component Regulatory System Involved in the Regulation of Flagella and Motility by Quorum Sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology* **43**: pp 809-21.
- Stappenbeck TS, Hooper L V and Gordon J I (2002) Developmental Regulation of Intestinal Angiogenesis by Indigenous Microbes Via Paneth Cells. *PNAS* **99**: pp 15451-5.
- Stevens MP, Roe A J, Vlisidou I, van Diemen P M, La Ragione R M, Best A, Woodward M J, Gally D L and Wallis T S (2004) Mutation of ToxB and a Truncated Version of the Efa-1 Gene in *Escherichia coli* O157:H7 Influences the Expression and Secretion of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Proteins but Not Intestinal Colonization in Calves or Sheep. *Infect Immun* **72**: pp 5402-11.
- Stevens MP, van Diemen P M, Frankel G, Phillips A D and Wallis T S (2002) Efa1 Influences Colonization of the Bovine Intestine by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O5 and O111. *Infect. Immun.* **70**: pp 5158-66.

Strockbine NA, Jackson M P, Sung L M, Holmes R K and O'Brien A D (1988) Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga Toxin From *Shigella Dysenteriae* Type 1. *J Bacteriol* **170**: pp 1116-22.

Strockbine NA, Marques L R, Newland J W, Smith H W, Holmes R K and O'Brien A D (1986) Two Toxin-Converting Phages From *Escherichia coli* O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins With Similar Biologic Activities. *Infect Immun* **53**: pp 135-40.

Sung LM, Jackson M P, O'Brien A D and Holmes R K (1990) Transcription of the Shiga-Like Toxin Type II and Shiga-Like Toxin Type II Variant Operons of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: pp 6386-95.

Surette MG, Miller M B and Bassler B L (1999) Quorum Sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a New Family of Genes Responsible for Autoinducer Production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: pp 1639-44.

Sutton MD, Smith B T, Godoy V G and Walker G C (2000) The SOS Response: Recent Insights into UmuDC-Dependent Mutagenesis and DNA Damage Tolerance. *Annu Rev Genet* **34**: pp 479-97.

I

Taga ME, Semmelhack J L and Bassler B L (2001) The LuxS-Dependent Autoinducer AI-2 Controls the Expression of an ABC Transporter That Functions in AI-2 Uptake in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology* **42**: pp 777-93.

Tannock G.W. The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract (1994). Gibson S. A. W. pp 1-16.. London, Springer-Verlag.

Tarr PI, Bilge S S, Vary J C Jr, Jelacic S, Habeeb R L, Ward T R, Baylor M R and Besser T E (2000) Iha: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Conferring Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. *Infect Immun* **68**: pp 1400-7.

Tatsuno I, Nagano K, Taguchi K, Rong L, Mori H and Sasakawa C (2003) Increased Adherence to Caco-2 Cells Caused by Disruption of the YhiE and YhiF Genes in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **71**: pp 2598-606.

te Loo DMWM, Monnens L A H, van der Velden T J A M, Vermeer M A, Preyers F, Demacker P N M, van den Heuvel L P W J and van Hinsbergh V W M (2000) Binding and Transfer of Verocytotoxin by Polymorphonuclear Leukocytes in Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* **95**: pp 3396-402.

Teel LD, Melton-Celsa A R, Schmitt C K and O'Brien A D (2002) One of Two Copies of the Gene for the Activatable Shiga Toxin Type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 Strain B2F1 Is Associated With an Inducible Bacteriophage. *Infect Immun* **70**: pp 4282-91.

Tesh VL, Burris J A, Owens J W, Gordon V M, Wadolkowski E A, O'Brien A D and Samuel J E (1993) Comparison of the Relative Toxicities of Shiga-Like Toxins Type I and Type II for Mice. *Infect. Immun.* **61**: pp 3392-402.

Thomas T and Thomas T J (2001) Polyamines in Cell Growth and Cell Death: Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications. *Cell Mol Life Sci* **58**: pp 244-58.

Tilden J Jr, Young W, McNamara A M, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair M A, Majkowski J, Vugia D, Werner S B, Hollingsworth J and Morris J G Jr (1996) A New Route of Transmission for *Escherichia coli*: Infection From Dry Fermented Salami. *Am J Public Health* **86**: pp 1142-5.

Traskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda D P, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P and Kokesova A (2004) Commensal Bacteria (Normal Microflora), Mucosal Immunity and Chronic Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Immunology Letters* **93**: pp 97-108.

Toma C, Higa N, Iyoda S, Rivas M and Iwanaga M (2006) The Long Polar Fimbriae Genes Identified in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Are Present in Other Diarrheagenic *E. coli* and in the Standard *E. coli* Collection of Reference (ECOR) Strains. *Research in Microbiology* **157**: pp 153-61.

Torres AG, Giron J A, Perna N T, Burland V, Blattner F R, Avelino-Flores F and Kaper J B (2002) Identification and Characterization of LpfABCC'DE, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **70**: pp 5416-27.

Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H and Nishikawa Y (2007) Enhancement of Shiga Toxin Production in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O157:H7 by DNase Colicins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: pp 7582-8.

Trachtman H and Christen E (1999) Pathogenesis, Treatment, and Therapeutic Trials in Hemolytic Uremic Syndrome. *Curr Opin Pediatr* **11**: pp 162-8.

Tyler JS, Mills M J and Friedman D I (2004) The Operator and Early Promoter Region of the Shiga Toxin Type 2-Encoding Bacteriophage 933W and Control of Toxin Expression. *J. Bacteriol.* **186** : pp 7670-9.

Tyler SD, Johnson W M, Lior H, Wang G and Rozee K R (1991) Identification of Verotoxin Type 2 Variant B Subunit Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* **29**: pp 1339-43.

U

Umanski T, Rosenshine I and Friedberg D (2002) Thermoregulated Expression of Virulence Genes in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: pp 2735-44.

Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S and Okada Y (1993) Expansion of Alpha Beta T-Cell Receptor-Bearing Intestinal Intraepithelial Lymphocytes After Microbial Colonization in Germ-Free Mice and Its Independence From Thymus. *Immunology* **79**: pp 32-7.

V

Vernozy-Rozand C (1997) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Verocytotoxin-Producing *E. coli* (VTEC) in Food. *J Appl Microbiol* **82**: pp 537-51.

Vlisidou I, Marches O, Dziva F, Mundy R, Frankel G and Stevens M P (2006) Identification and Characterization of EspK, a Type III Secreted Effector Protein of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* **263**: pp 32-40.

Voigt W, Fruth A, Tschape H, Reissbrodt R and Williams P H (2006) Enterobacterial Autoinducer of Growth Enhances Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **44**: pp 2247-29.

Vora P, Youdim A, Thomas L S, Fukata M, Tesfay S Y, Lukasek K, Michelsen K S, Wada A, Hirayama T, Arditi M and Abreu M T (2004) {Beta}-Defensin-2 Expression Is Regulated by TLR Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* **173**: pp 5398-405.

W

Wadolowski EA, Sung L M, Burriss J A, Samuel J E and O'Brien A D (1990) Acute Renal Tubular Necrosis and Death of Mice Orally Infected With *Escherichia coli* Strains That Produce Shiga-Like Toxin Type II. *Infect. Immun.* **58**: pp 3959-65.

Wagner PL, Acheson D W and Waldor M K (1999) Isogenic Lysogens of Diverse Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages Produce Markedly Different Amounts of Shiga Toxin. *Infect Immun* **67**: pp 6710-4.

Wagner PL, Acheson D W K and Waldor M K (2001) Human Neutrophils and Their Products Induce Shiga Toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**: pp 1934-37.

Wales AD, Pearson G R, Skuse A M, Roe J M, Hayes C M, Cookson A L and Woodward M J (2001) Attaching and Effacing Lesions Caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Inoculated Neonatal Lambs. *J Med Microbiol* **50**: pp 752-8.

Walters M, Sircili M P and Sperandio V (2006) AI-3 Synthesis Is Not Dependent on LuxS in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **188**: pp 5668-81.

Walters M and Sperandio V (2006) Autoinducer 3 and Epinephrine Signaling in the Kinetics of Locus of Enterocyte Effacement Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **74**: pp 5445-55.

Wang D, Ding X and Rather P N (2001) Indole Can Act As an Extracellular Signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: pp 4210-6.

Wang L, Hashimoto Y, Tsao C-Y, Valdes J J and Bentley W E (2005) Cyclic AMP (CAMP) and CAMP Receptor Protein Influence Both Synthesis and Uptake of Extracellular Autoinducer 2 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: pp 2066-76.

Wang RF, Beggs M L, Erickson B D and Cerniglia C E (2004) DNA Microarray Analysis of Predominant Human Intestinal Bacteria in Fecal Samples. *Mol Cell Probes* **18**: pp 223-34.

Wang RF, Beggs M L, Robertson L H and Cerniglia C E (2002) Design and Evaluation of Oligonucleotide-Microarray Method for the Detection of Human Intestinal Bacteria in Fecal Samples. *FEMS Microbiol Lett* **213**: pp 175-82.

Watanabe T, Kitani A, Murray P J and Strober W (2004) NOD2 Is a Negative Regulator of Toll-Like Receptor 2-Mediated T Helper Type 1 Responses. *Nat Immunol* **5**: pp 800-8.

Waters CM and Bassler B L (2005) Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: pp 319-46.

Wells JG, Shipman L D, Greene K D, Sowers E G, Green J H, Cameron D N, Downes F P, Martin M L, Griffin P M, Ostroff S M and et a l (1991) Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga-Like-Toxin-Producing *E. coli* From Dairy Cattle. *J Clin Microbiol* **29**: pp 985-9.

Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, Karch H, Klare B, Pfeffer K, Emmrich P and Oberhoffer R (2000) Inflammatory and Immunological Parameters in Children With Haemolytic Uremic Syndrome (HUS) and Gastroenteritis-Pathophysiological and Diagnostic Clues. *Cytokine* **12**: pp 822-7.

Whitehouse CA, Balbo P B, Pesci E C, Cottle D L, Mirabito P M and Pickett C L (1998) *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G2-Phase Cell Cycle Block. *Infect Immun* **66**: pp 1934-40.

Whittam TS (1995) Genetic population structure and pathogenicity of enteric bacteria, in *Population Genetics of Bacteria* Camb. Univ. Press, Cambridge U.K.

Whittam TS (1998) Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin-producing *E. coli* strains., in *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-Toxin-Producing E. Coli Strains*. (Kaper JB and O'Brien AD eds) pp 195-209, ASM press, Washington D.C.

Wieler LH, McDaniel T K, Whittam T S and Kaper J B (1997) Insertion Site of the Locus of Enterocyte Effacement in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Differs in Relation to the Clonal Phylogeny of the Strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**: pp 49-53.

Wilkinson MHF and Schut F (1998) Quantitative Measurements of Intestinal Ecology Dy Digital Image Analysed Microscopy. *Bioscience Microflora* **17**: pp 7-14.

Willshaw GA, Smith H R, Scotland S M, Field A M and Rowe B (1987) Heterogeneity of *Escherichia coli* Phages Encoding Vero Cytotoxins: Comparison of Cloned Sequences Determining VT1 and VT2 and Development of Specific Gene Probes. *J Gen Microbiol* **133**: pp 1309-17.

Wilson JB, Clarke R C, Renwick S A, Rahn K, Johnson R P, Karmali M A, Lior H, Alves D, Gyles C L, Sandhu K S, McEwen S A and Spika J S (1996) Vero Cytotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Dairy Farm Families. *J Infect Dis* **174**: pp 1021-7.

Wilson, KH and Blitchington, RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: pp 2273-8.

Wong CS, Jelacic S, Habeeb R L, Watkins S L and Tarr P I (2000) The Risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome After Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *N Engl J Med* **342**: pp 1930-1936.

X

Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma M A, Jordan D M, Francetic O, Kaper J B, Puente J L and Giron J A (2007) Intestinal Adherence Associated With Type IV Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest.*

Y

Yao Y, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ (2005) Backbone and Side Chain 1H, 13C and 15N Assignments for *Escherichia coli* SdiA1-171, the Autoinducer-Binding Domain of a Quorum Sensing Protein. *J Biomol NMR* **31**: pp 373-4.

Yona-Nadler C, Umanski T, Aizawa S, Friedberg D and Rosenshine I (2003) Integration Host Factor (IHF) Mediates Repression of Flagella in Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: pp 877-84.

Z

Zhang L, Chaudhuri R R, Constantinidou C, Hobman J L, Patel M D, Jones A C, Sarti D, Roe A J, Vlisidou I, Shaw R K, Falciani F, Stevens M P, Gally D L, Knutton S, Frankel G, Penn C W and Pallen M J (2004) Regulators Encoded in the *Escherichia coli* Type III Secretion System 2 Gene Cluster Influence Expression of Genes Within the Locus for Enterocyte Effacement in Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**: pp 7282-93.

Zhang W, Bielaszewska M, Friedrich A W, Kuczius T and Karch H (2005) Transcriptional Analysis of Genes Encoding Shiga Toxin 2 and Its Variants in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**: pp 558-61.

Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T and Karch H (2002) Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (Stx1c) in *Escherichia coli* Strains Isolated From Humans. *J. Clin. Microbiol.* **40**: pp 1441-6.

Zhao T, Doyle M P, Shere J and Garber L (1995) Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a Survey of Dairy Herds. *Appl Environ Microbiol* **61**: pp 1290-3.

Zoetendal EG, Akkermans A D and De Vos W M (1998) Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA From Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: pp 3854-9.

Zoetendal EG, Vaughan E E and de Vos W M (2006) A Microbial World Within Us. *Mol Microbiol* **59**: pp 1639-50.

ANNEXES



Annexe I

Composition et préparation des milieux de culture

- **Milieu complet** (Leedle and Hespell, 1980)

Composition pour 1 litre de milieu :

- Jus de rumen clarifié : 400 ml
- KH_2PO_4 12 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12 g
- NaCl 12 g
- MgSO_4 1.2 g
- CaCl_2 1.2 g
- Trypticase : 2 g
- Extrait de levure : 0.5 g
- Solution d'hémine 0.1% : 1 ml
- Solution d'AGV : 10 ml

(acide acétique 2%, acide isobutyrique 0.1 %, acide isovalérique 0.12 %, acide n-valérique 0.12 %, acide 2-méthyl-butyrique 0.12 %)

- Résazurine 0.1% : 1 ml
- Glucose : 2 g
- Cellobiose : 2 g
- Maltose : 2 g
- Amidon soluble : 2 g
- Eau distillée : 438 ml

Ajuster le pH à 6.8

Porter à ébullition. Refroidir à 60°C et ajouter :

- NaHCO_3 : 4 g
- Cystéine HCl : 0.5 g
- Milieu de dilution

Composition pour 1 litre de solution :

- K_2HPO_4 12 g

MgSO₄,7H₂O : 1 g
MnCl₂,4H₂O : 0.1 g
FeCl₃,6H₂O : 0.0135 g
CaCl₂,2H₂O : 0.04 g
Eau distillée : qsp 100ml

Annexe II

Amorces et conditions de RFLP-PCR

Conditions de PCR

Mélange réactionnel pour la réaction d'amplification

ADN : 5 µl de lysat bactérien brut

DNTP : 0,4 µl des quatre DNTP à 100 µM

Polymérase : 0,75 unité de Taq polymérase QBiogen

Amorce 1 : 1 µl d'une solution à 10 µM

Amorce 2 : 1 µl d'une solution à 10 µM

Tampon : 5 µl de tampon 10X

Eau : qsp 50 µl d'eau bidistillée.

Couple d'amorces	Sequence (5' vers 3')	Spécificité génique	Taille de l'amplicon pb	Localisation	Tm (°C)
VT2-c VT2-d	AAG AAG ATG TTT ATG GCG GT CAC GAA TCA GGT TAT GCC TC	Stx2 Stx2vh-a Stx2vh-b Stx2-NV206	285	SU B 4 - UTR 21	48 52
VT2-cm VT2-f	AAG AAG ATA TTT GTA GCG G TAA ACT GCA CTT CAG CAA AT	Stx2d-Ount Stx2d-OX3a Stx2d-O111	256	SU B 4-259	50,2 51,2
VTe-a VTe-b	CCT TAA CTA AAA GGA ATA TA CTG GTG GTG TAT GAT TAA TA	Stx2e	230	UTR -25 - SU A 205	47,1 51,2

Amorces et conditions de PCR:

Conditions de RFLP :

Mélange réactionnel (pour 24 µl) :

ADN : 20 µl du produit de PCR

Etape	T (°C)	Durée (min)	
Dénat.	94	5	} 30 cycles
Dénat.	94	2	
Hybridation	52	1	
Polymer.	72	1	
Polymer.	72	7	

Enzyme	Taille des fragments de restriction (pb) après PCR avec VT2-c et VT2-d			
	Variants			
	Stx2	Stx2vh-a	Stx2vh-b	Stx2-NV206
HaeIII	285	161 124	161 124	285
RsaI	216 69	136 80 69	216 69	216 69
NciI	285	285	159 126	159 126

Tampon : 2,4 µl de tampon 10X spécifique de l'enzyme

Enzyme : 0,4 µl d'enzyme (NciI : 0,8 U ; RsaI et HaeIII : 0,4 U)

Enzyme	Tampon
Nci I	4 (NEBiolabs)
Rsa I	L (Roche)
Hae III	M (Roche)

Annexe III

Composition des tampons utilisés en ELISA et en Dot-Blot

- - tampon carbonate-bicarbonate :

Na₂CO₃ : 1,59 g/l

NaHCO₃ : 2,94 g/

NaN₃ : 0,2 g

Eau distillée : qsp 1 l

- solution de saturation (ELISA):

PBS : 1 X

BSA : 4 g/l

- solution de saturation (Dot-Blot):

PBS : 1 X

Lait : 0,5 % (p/v)

- tampon de dilution antigènes (ELISA et Dot-Blot) et anticorps (ELISA):

PBS : 1 X

BSA : 1 g/l

- solution de dilution anticorps Dot-Blot:

PBS : 1 X

Lait : 0,1 % (p/v)

- tampon de lavage (ELISA et Dot-blot):

PBS : 1 X

Tween 20 : 0,05 % (v/v)

Annexe IV

Conditions de PCR quantitative en LightCycler®

→ **composition du mélange réactionnel pour chaque tube :**

- MgCl₂ 25 mM : 2,4 µl.
- amorce 1 10 mM: 1 µl.
- amorce 2 10 mM: 1 µl.
- eau dépourvue de RNases : 12,6 µl.
- SybR Green : 1 µl.
- Centrifuger pendant 15 secondes, introduire les capillaires dans le LightCycler puis lancer le programme de PCR quantitative :
 - **Dénaturation** : → 95 °C ; 10minutes.
 - **PCR : 45 cycles** : → 95 °C ; 15 secondes.

→ 51 °C (amorces sens Stx2a et Stx2-FA); 5 secondes

ou → 57 °C (amorce sens Stx2b); 5 secondes.

→ 72 °C ; 8 secondes.

- **Melting curves** : → 95 °C ; 15 secondes.
→ 65 °C ; 5 secondes.
- **Refroidissement** : → 45 °C ; 30 secondes.

Annexe V

Solutions utilisées pour le dosage de l'activité β -galactosidase

Tampon Z :

Na_2HPO_4 : 60 mM

NaH_2PO_4 : 40 mM

KCl: 10 mM

MgSO_4 : 1 mM

β -mercaptoethanol: 50 mM

Solution de lyse:

Chloroforme

Sodium Dodécyl Sulfate: 0,1 % (p/v)

Solution d'ONPG:

Tampon phosphate: 0,1 M

ONPG: 4 mg/ml

Solution d'arrêt:

Na_2CO_3 : 1 M

Annexe VI

Alignements des séquences protéiques des variants Stx2 étudiés par Paton.

A Subunit

	↓
SLT-II/933W	MKCILFKWVLCLLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSQSYVSSLNSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHT-HGSYFAVDIRGLDVYQARFDHLR
SLT-II/0111M.....PP.....
SLT-II/OX3aM.....PP.....
SLT-II/OX3bP.....M.....PP.....
SLT-II/048PP.....
SLT-II/933W	LIIEQNLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHISVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAALERSGMQISRHSLVSSYLALNEFSGNTMTRDASRAV
SLT-II/0111
SLT-II/OX3a
SLT-II/OX3b
SLT-II/048D.....
SLT-II/933W	<u>LRFVTVTAEALRFRQIQREFRQALSETAPVYTMTPGDVDLTLNWGRISNVLPEYRGEDGVRVGRISFNNISAILGTVAVILNCHHQGARS</u>
SLT-II/0111G.....EE.....F..G.....
SLT-II/OX3aEE.....F..G.....
SLT-II/OX3b
SLT-II/048
SLT-II/933W	VRAVNEESQPECQITGDRPVIKINNTLWESNTAAFLNRKSQFLYTTGK
SLT-II/0111I.....R.....RAHS.N.S.E
SLT-II/OX3aI.....R.....RAHS.N.S.E
SLT-II/OX3b
SLT-II/048

B Subunit

	↓
SLT-II/933W	MKKMFMAVLFALASVNAMEADCAKGIIEFSKYNEDDTFTVKVDGKEYWTSRWNLQPLLQSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFNND
SLT-II/0111	...I.V.A...FV.....N.....A.....N.....N.A.....--
SLT-II/OX3a	...I.V.A...FV.....P.....N.....A.....N.....N.A.....--
SLT-II/OX3bV.....N.....A.....
SLT-II/048V.....

Les séquences protéiques des variants Stx2 (SLT-II) sont alignées avec la séquence protéique du variant Stx2 du bactériophage 933W présente dans les banques de données. La région de 18 acides aminés conservée entre Stx1 et Stx2 est soulignée. Les points représentent les résidus conservés et les tirets les résidus manquants. Les flèches indiquent le début du polypeptide mature pour chacune des sous-unités (Paton *et al.*, 1995).

PUBLICATIONS

**PUBLICATION N° 1. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *STX*₂
VARIANTS IN SHIGA TOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI*
BELONGING TO SEROPATHOTYPES A AND C**

Differential expression of *stx*₂ variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C

Thibaut de Sablet, Yolande Bertin, Marjolaine Vareille, Jean-Pierre Girardeau, Annie Garrivier, Alain P. Gobert and Christine Martin

INRA, UR454 Unité de Microbiologie, 63122 St-Genès-Champagnelle, France

Correspondence

Christine Martin

cmartin@clermont.inra.fr

Only a subset of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) are human pathogens, but the characteristics that account for differences in pathogenicity are not well understood. In this study, we investigated the distribution of the *stx* variants coding for Stx2 and its variants in highly virulent STEC of seropathotype A and low-pathogenic STEC of seropathotype C. We analysed and compared transcription of the corresponding genes, production of Shiga toxins, and *stx*-phage release in basal as well as in induced conditions. We found that the *stx*₂ variant was mainly associated with strains of seropathotype A, whereas most of the strains of seropathotype C possessed the *stx*_{2-vhb} variant, which was frequently associated with *stx*₂, *stx*_{2-vha} or *stx*_{2-c}. Levels of *stx*₂ and *stx*₂-related mRNA were higher in strains belonging to seropathotype A and in those strains of seropathotype C that express the *stx*₂ variant than in the remaining strains of seropathotype C. The *stx*_{2-vhb} genes were the least expressed, in basal as well as in induced conditions, and in many cases did not seem to be carried by an inducible prophage. A clear correlation was observed between *stx* mRNA levels and *stx*-phage DNA in the culture supernatants, suggesting that most *stx*₂-related genes are expressed only when they are carried by a phage. In conclusion, some relationship between *stx*₂-related gene expression *in vitro* and the seropathotype of the STEC strains was observed. A higher expression of the *stx*₂ gene and a higher release of its product, in basal as well as in induced conditions, was observed in pathogenic strains of seropathotype A. A subset of strains of seropathotype C shows the same characteristics and could be a high risk to human health.

Received 11 May 2007

Revised 3 September 2007

Accepted 3 October 2007

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are food-borne pathogens that cause human diseases ranging from uncomplicated diarrhoea to haemorrhagic colitis (HC) and life-threatening complications, such as the haemolytic-uraemic syndrome (HUS). Cattle and other ruminants appear to be the main reservoir of STEC strains. While most outbreaks are associated with *E. coli* O157:H7, mainly in North America and Japan, approximately half of the sporadic cases may be due to non-O157:H7 serotypes (Banatvala *et al.*, 2001). Many non-O157 strains responsible for HUS do not possess the locus of enterocyte effacement (LEE) (Banatvala *et al.*, 2001), a pathogenicity

island encoding a type III secretion system recognized as a major virulence factor (Girardeau *et al.*, 2005; Garmendia *et al.*, 2005). STEC strains were classified into five seropathotypes (A to E) by Karmali *et al.* (2003) according to their incidence and association with HUS cases and outbreaks. Seropathotypes A and B include strains belonging to serotypes associated with HUS cases and outbreaks and containing the LEE. Seropathotype C includes LEE-negative isolates associated with sporadic cases of HUS but not with outbreaks. The virulence mechanisms of this group of strains are not well understood, and to date it is not possible to distinguish among these strains those which are a high risk to human health. Seropathotype D includes isolates rarely found in humans and associated with less severe disease (diarrhoea and HC). Seropathotype E includes serotypes that have never been found in humans.

The major characteristic of STEC linked to haemolytic symptoms is the production of Shiga toxins (Stx1, Stx2), which inhibit protein synthesis (Karmali *et al.*, 1985; Paton & Paton, 1998). Members of the Stx family are AB holotoxins comprising one A subunit, which is the active

Abbreviations: HC, haemolytic colitis; HUS, haemolytic-uraemic syndrome; LB, Luria-Bertani broth; LEE, locus of enterocyte effacement; q-PCR, quantitative real-time PCR; STEC, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

Two supplementary figures are available with the online version of this paper.

component of the toxin, covalently bound to five identical B subunits. The B subunits form a pentameric structure required for toxin binding to its receptor, the glycolipid Gb3. Epidemiological studies, together with *in vivo* and *in vitro* experiments, have revealed that Stx2 is the most important virulence factor associated with severe human disease. Indeed, Stx2 is 1000 times more cytotoxic than Stx1 towards human renal endothelial cells, and STEC producing Stx2 are more commonly associated with serious diseases than isolates producing Stx1 or Stx1 plus Stx2 (Louise & Obrig, 1995; Boerlin *et al.*, 1999; Paton & Paton, 1998). Several Stx2 variants have been identified on the basis of sequence homology and immunological cross-reactivity (Ito *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1991; Paton *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 2002; Pierard *et al.*, 1998). The most frequent variants identified so far in strains of human and bovine origin are Stx2, Stx2-vha, Stx2-vhb and Stx2c. Stx2 is the toxin produced by the prototype O157:H7 strains EDL933 and Sakai. Stx2-vha and Stx2-vhb were first described in an *E. coli* O91:H21 strain isolated from a patient with HUS (Ito *et al.*, 1990), and were also named Stx2d1 and Stx2d2, respectively (Teel *et al.*, 2002). Stx2c was found in the *E. coli* O157:H⁻ strain E32511, a clinical isolate associated with HUS (Schmitt *et al.*, 1991). Stx2-vha (AF479828-1), Stx2-vhb (AF479829-1) and Stx2c (M59432-1) have 99%, 97.4% and 100% sequence identity in their mature A subunit and 97.1% identity in their mature B subunit to the corresponding subunit of Stx2 (Y10775). These percentage values correspond to a maximum of three amino acid changes in each subunit. However, it has been suggested that Stx2 sequence variations may affect the capacity of a given Stx2-producing *E. coli* strain to cause disease (Lindgren *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995).

The genes encoding Shiga toxins (*stx*) are generally carried by lambdoid bacteriophages and can be induced by DNA-damaging agents such as mitomycin C (Muhldorfer *et al.*, 1996). As a result of the induction process, expression of *stx*₂ genes, which is under the control of a late phage promoter (Wagner *et al.*, 2001), is activated. Bacterial host cells lyse and release Shiga toxins and free phage particles into the environment. Epidemiological observations and animal models suggest that the severity of the disease is correlated with the amount of Stx produced during infection (Zhang *et al.*, 2000; Dean-Nystrom *et al.*, 2003). However, expression of *stx* genes and their ability to be induced depending on the *stx*₂ variant or the relative virulence of the STEC strain is not well documented.

Most previous studies investigating the virulence traits of LEE-negative strains were based on the distribution of virulence-associated genes or of genomic islands rather than on their expression and production of the virulence factors. Here, we examined whether seropathotype A and seropathotype C STEC differ in their basal and inducible *stx* expression in an *in vitro* model. Furthermore, association of *stx*₂ and *stx*₂-related genes with an inducible prophage was investigated.

METHODS

Bacterial strains, cell lines, phage induction, and growth conditions. Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The mutants of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 lacking the *stx*₁, the *stx*₂, or the *stx*₁ and *stx*₂ genes were constructed in our laboratory (Gobert *et al.*, 2007). Bacterial strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium. For Stx2 production under mitomycin C induction, overnight cultures of each isolate were subcultured in 7 ml fresh LB medium or in DMEM low glucose (Invitrogen no. 11880) with 4 mM L-glutamine and grown at 37 °C with rotary shaking at 180 r.p.m. The OD₆₀₀ was measured using 1 cm cuvettes with a Jenway 6300 spectrophotometer. When the OD₆₀₀ reached 0.2–0.3 (*t*₀), the cultures were divided into two tubes, and mitomycin C (250 ng ml⁻¹) was added to one of the tubes. Then the bacteria were grown at 37 °C with rotary shaking up to 6 h. Bacterial growth was monitored spectrophotometrically after appropriate dilution (two- to fivefold) of the samples in LB or DMEM medium. Three hours after mitomycin C treatment (*t*₃), 6 ml of culture was harvested from each tube and centrifuged for 15 min at 3000 g. The supernatants were filtered through 0.45 µm filters (Sartorius) and used for Stx2 ELISA and detection of phage particles; the pellets were used for RNA extraction. For some strains, levels of *stx* mRNA were also measured at *t*_{1.5} and phage DNA at *t*₆.

stx₂ subtyping. *stx*₂ subtyping was performed by PCR-RFLP on the *stx*_{2B} gene as previously described by Bertin *et al.* (2001) to discriminate between *stx*₂ (Y10775), *stx*_{2-vhb} (AF479829-1) and *stx*_{2-vha/stx}_{2c} variants. For distinction between *stx*_{2-vha} (AF479828-1) and *stx*_{2c} (M59432-1) variants, primers were designed in the *stx*_{2A} gene (forward, 5'-GATGGCGGTCCATTATC-3'; reverse, 5'-CGGT-AGAAAGTATTTGTTG-3') that amplify a 529 bp DNA fragment on the genomic DNA of strains carrying *stx*_{2-vha} or *stx*_{2c}. After *EcoRV* digestion of this fragment, *stx*_{2c} variants show two DNA fragments of 329 bp and 200 bp whereas *stx*_{2-vha} DNA remains uncut. The online version of this paper contains a supplementary figure (Fig. S1) showing the nucleotide sequence alignment of the gene encoding the A subunit of *stx*₂, *stx*_{2-vha}, *stx*_{2-vhb} and *stx*_{2c}, with the location of the primers and the *EcoRV* restriction site, and a photograph of the electrophoresis gel showing the DNA fragments obtained with the PCR-RFLP assay that differentiates *stx*_{2c} from *stx*_{2-vha}.

The presence of genes encoding Stx2 activatable by elastase was investigated using PCR with primers SLT-II-vc and CKS2 and restriction analysis of the resulting 890 bp amplicon with *PstI* as described by Jelacic *et al.* (2003). Absence of the *PstI* site can be taken as an indicator of the presence of a mucus-activatable *stx*₂ variant (Bielaszewska *et al.*, 2006; Gobius *et al.*, 2003; Jelacic *et al.*, 2003).

RNA extraction and quantitative real-time PCR (q-PCR).

Following mitomycin C induction for 3 h, total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel). RNA concentration was determined by measuring the A₂₆₀ in a 96-well plate reader (Biotek µQuant) after 50-fold dilution in RNase-free water. One microgram of each RNA sample was reverse transcribed with Superscript II Enzyme (Invitrogen) and 1 µl of random primers (Invitrogen) in a final volume of 20 µl for 50 min at 42 °C. Three q-PCRs were carried out for each sample on diluted cDNA by using the LightCycler apparatus (Roche) with 0.5 µM of each primer, 4 mM MgCl₂, 1 µl of LightCycler Faststart DNA Master SYBR green I (Roche) and 2 µl of cDNA (1 ng, 100 pg and 10 pg) in microcapillary tubes in a final volume of 20 µl. Primers 2SF (CACATTTACAG-TGAAGTTGA) and 2R (TTCAGCAAATCCGGAGCCTG) allowed amplification of an *stx*₂ fragment but not of an *stx*_{2-vhb} fragment. Primers 2bSF (TACATTCACAGTAAAAGTGCC) and 2R allowed amplification of an *stx*_{2-vhb} fragment but not of an *stx*₂ fragment. *stx*_{2-vha} and *stx*_{2c} fragments were amplified using primers 2a

Table 1. Characteristics of STEC strains

Strain*	Serotype	<i>stx</i> ₂ genotype†	<i>stx</i> ₁ ‡	Origin§	Seropathotype	Source or reference
86-24*	O157:H7	<i>stx</i> ₂	N	H/outbreak	A	T. Whittam
CH1898	O157:H7	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2c}	N	H/HUS	A	V. Livrelli
CHVi-1*	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	N	H/HUS	A	V. Livrelli
Sakai*	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/outbreak	A	T. Whittam
EDL 933*	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	Meat/outbreak	A	O'Brien <i>et al.</i> (1983)
CHO75	O157:H7	<i>stx</i> ₂	N	H/HUS	A	V. Livrelli
A8993-CS2	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/HC	A	T. Whittam
85-08*	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/D	A	T. Whittam
93-111	O157:H7	<i>stx</i> ₂	P	H/outbreak	A	T. Whittam
NV95*	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	P	B	A	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV203	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV253	O113:H21	<i>stx</i>₂ <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV254*	O113:H21	<i>stx</i>₂ <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV166*	O113:H21	<i>stx</i>_{2c}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV170	O113:H21	<i>stx</i>_{2c}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV297	O113:H21	<i>stx</i>_{2c} <i>stx</i>_{2-vhb}	P	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV298	O113:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV299	O113:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV300	O113:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	P	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV302	O113:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV237*	O113:H21	<i>stx</i> ₂	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
E-D226*	O113:H21	<i>stx</i> _{2-vhb}	N	H	C	A. Caprioli
CL-15*	O113:H21	<i>stx</i>₂ <i>stx</i>_{2-vhb}	N	H/HUS	C	T. Whittam
DEC16A*	O113:H21	<i>stx</i>_{2-vhb}	N	H/D	C	T. Whittam
CL-3*	O113:H21	<i>stx</i>₂ <i>stx</i>_{2-vhb}	N	H/HUS	C	T. Whittam
87-307*	O113:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	H/HUS	C	T. Whittam
NV148*	O91:H10	<i>stx</i>_{2-vha}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV271	O91:H10	<i>stx</i>_{2c}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV280	O91:H10	<i>stx</i> _{2c}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV130	O91:H10	<i>stx</i>_{2c} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV199*	O91:H10	<i>stx</i>_{2c} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV308*	O91:H10	<i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
CB6775*	O91:H10	<i>stx</i>₂	N	H	C	L. Beutin
E-D76*	O91:H21	<i>stx</i>₂ <i>stx</i>_{2-vhb}	P	H	C	A. Caprioli
87-2927*	O91:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	P	H/HUS	C	T. Whittam
VTH-13*	O91:H21	<i>stx</i> ₂	P	H/ HC	C	J. Blanco Alvarez
B2F1*	O91:H21	<i>stx</i>_{2-vha} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	H/HUS	C	Ito <i>et al.</i> (1990)
NV200*	O91:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV197	O91:H21	<i>stx</i> ₂ <i>stx</i> _{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV127*	O91:H21	<i>stx</i>_{2c} <i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV32	O91:H21	<i>stx</i>_{2-vhb}	N	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)
NV74	O91:H21	<i>stx</i>_{2-vhb}	P	B	C	Pradel <i>et al.</i> (2000)

*Strain used for q-PCR and ELISA experiments.

†Variants in bold have the mucus-activatable genotype.

‡N, absence of the *stx*₁ gene; P, presence of the *stx*₁ gene.

§H, human-derived strain; HUS, isolated from a clinical case of HUS; HC, isolated from a clinical case of haemorrhagic colitis; D, isolated from a patient with diarrhoeal symptoms; B, bovine-derived strain.

||Lothar Beutin, Robert Koch Institute, Berlin, Germany; Jorge Blanco Alvarez, Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain; Alfredo Caprioli, Laboratorio di Medicina Veterinaria, Rome, Italy; Valérie Livrelli, Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; Thomas Whittam, National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, USA, STEC Center. Strains supplied by T. Whittam were obtained from <http://shigatox.net>.

(TAAAAGTGGCCGAAAAGAG) and 2R. *stx*₂ and *tufA* mRNAs were quantified by noting the fluorescence crossing-point (CP) of the samples on the corresponding standard curve. Results are the mean

ratios between the copy number of *stx*₂ mRNA and the copy number of *tufA* mRNA. Control reactions were performed without reverse transcriptase to confirm that the target detected was RNA. Standard

curves for *stx* quantification were obtained by PCR amplification of genomic DNA from EHEC strains containing only one of the different *stx*₂ variants with the universal *stx*₂ primers 2F-0 (TATATCAGTGCCCGGTGTGA) and 2R-0 (CATTATTAAGCTGCACTTCAGC). The PCR products (884 bp) were purified with the Strataprep PCR purification kit (Stratagene) and DNA amounts were quantified by measuring the A₂₆₀ in a 96-well plate reader (Biotek µQuant). This amount was converted to molecule number as previously described (Fronhoffs *et al.*, 2002). Then PCR products were 10-fold serially diluted from 5 × 10⁸ to 50 molecules µl⁻¹ and three q-PCRs were carried out in a LightCycler apparatus (Roche) with primers 2SF and 2R, 2bSF and 2R, and 2a and 2R, generating standard curves for *stx*₂, *stx*_{2-vhb} and *stx*_{2-vha/stx}_{2c} respectively. The standard curve for *tufA* quantification was obtained in the same way using the genomic DNA of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 and the primers TufAF (CAGGTAGGCGTTCGGTACAT) and TufAR (GTGCAAAAAGGGCATCAAAT). After quantification of the molecule number, a q-PCR was done with primers TufAqF (TGGTTGATGACGAAGAGCTG) and TufAqR (GCTCTGGTTCGGAA-TGTAA) to obtain the standard curve.

Phage particle isolation and *stx*₂ DNA quantification. Phages were purified from non-induced or mitomycin C-induced cultures 3 h or 6 h after mitomycin C treatment as previously described (Fuchs *et al.*, 1999) with slight modifications according to Arthur Donohue-Rolfe, Cummings School of Veterinary Medicine at Tufts University (personal communication). Briefly, 5 ml samples of the filtered culture supernatants were incubated with 10 µg ml⁻¹ RNase A (Amersham) and 40 U ml⁻¹ DNase I (Amersham) for 30 min at 37 °C. Phage particles were pelleted by ultracentrifugation for 16 h at 76 000 g at 4 °C. The pellets were resuspended in 100 µl PBS. Phage suspensions were boiled for 5 min at 95 °C, diluted fivefold in PBS, then *stx*₂ and *stx*₂-related DNA was quantified by q-PCR using the same primers and standards as for mRNA quantification. Absence of bacterial DNA in phage lysates was confirmed by the absence of *tufA* DNA as assayed by PCR. This method of indirect phage quantification detects phage DNA after its release from phage particles upon lysis of the host strain by use of specific primers. The method is very sensitive and circumvents the problem of extreme instability of plaque-forming capabilities of Stx2 phages, which are lost within 2 h of storage (Fuchs *et al.*, 1999; Muniesa *et al.*, 2004b), and the difficulty of identification of *stx*₂-phage plaques, which are very small and not well visible on agar plates (Gamage *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2003).

Measurement of Stx2 concentration by ELISA. Sandwich ELISAs were performed in 96-well plates (Maxisorp, Nunc) using a monoclonal antibody against Stx2 (STX2-BB12, Toxin Technology) diluted 1:500 to coat the plates and a rabbit polyclonal antiserum against Stx2 diluted 1:2000 to detect the toxin. A standard curve was obtained with twofold serial dilutions of purified Stx2 (Toxin Technology). Detection was performed with a 1:10 000 dilution of horseradish peroxidase-goat IgG anti-rabbit (Pierce) and *o*-phenylenediamine (OPD, Sigma)-stable peroxidase substrate (Pierce). Absorbance was measured in a 96-well plate reader (Biotek µQuant) at 492 nm.

Statistical analyses. Data are expressed as means ± SEM. To analyse the effect of the mitomycin C treatment on *stx*₂ transcription or Stx2 production, statistical analyses were performed using SAS software (v 8.1). The origin of the strains, the *stx*₂ variant and the serotype were considered to be independent variables. Due to the unequal number of strains in the groups, analysis of variance was performed using the Linear model procedure. Mean multiple comparison tests on log₁₀-transformed datasets were performed. The comparison method used was the Ryan-Einot-Gabriele-Welsh multiple range test. We made pairwise adjustments using the Tukey method. A *P* value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

The *stx*₂ variant is mostly associated with the most virulent strains

The prevalence of *stx*₂ and *stx*₂-related genes was investigated among 42 STEC strains. Nineteen strains isolated from humans with diarrhoea, HC or HUS, and 23 strains isolated from healthy cattle were selected (Table 1). Ten O157:H7 strains (nine from humans and one from cattle) belong to seropathotype A and as such possess the LEE. The remaining strains belong to seropathotype C and do not possess the LEE. Among them, 5 strains from humans and 11 strains from cattle belong to the O113:H21 serotype, 4 from humans and 5 from cattle are O91:H21, 1 from humans and 6 from cattle are O91:H10. These ratios between bovine- and human-derived strains for each serotype reflect the actual occurrence quite well, since O157:H7 strains are more frequently isolated from patients than from cattle, whereas O91:H10 strains are rarely found in humans (Caprioli *et al.*, 2005; Pradel *et al.*, 2000; Nataro & Kaper, 1998; Brooks *et al.*, 2005). Among the 42 selected strains, 22 contained only one *stx*₂ variant, and 20 contained two *stx*₂ variants. Only the *stx*₂, *stx*_{2-vha}, *stx*_{2-vhb} and *stx*_{2c} variants were found in these strains. The *stx*₂ variant was mainly associated with human-derived strains, especially the O157:H7 serotype, thus with strains of seropathotype A. This variant was the most frequently found in strains carrying only one *stx*₂ gene. In contrast, 13 strains of seropathotype C among 18 possessed *stx*_{2-vhb}, which was associated in 10 of them with *stx*_{2-vha}, *stx*_{2-vhb} or *stx*_{2c}.

It has been shown that the biological activity of the Stx2-vha and Stx2-vhb toxins is activatable by elastase cleavage of the last two amino acids of the enzymically active A subunit in the human or mouse intestinal mucus (Melton-Celsa *et al.*, 2002). Therefore all the isolates were further characterized for the possession of putative mucus-activatable Stx2 variants by PCR-RFLP analysis as described by Jelacic *et al.* (2003). The genes encoding *stx*_{2-vha} and *stx*_{2-vhb} B subunits were all associated with a putative activatable A subunit. In O157:H7 strains, the B subunits were all associated with a non-activatable A subunit. In non-O157:H7 strains, the association between A and B subunits was heterogeneous. Among 12 strains possessing an *stx*₂ B gene, 6 had a putative activatable A subunit. Among 8 strains possessing an *stx*_{2c} variant (indistinguishable *stx*_{2-vha/stx}_{2c} B gene, A gene with the PCR-RFLP pattern in the 5'-end characteristic of *stx*_{2c}), 7 showed the PCR-RFLP pattern in the A gene 3'-end characteristic of mucus-activatable toxins (Table 1).

Are strains carrying different *stx*₂ variants equally sensitive to mitomycin C?

A subset of 23 strains representative of each serotype and combinations of *stx*₂ variants found in the 42-strain

collection was chosen for a more detailed analysis of *stx*₂ and *stx*₂-related expression (Table 1). Treatment of bacteria with DNA-damaging agents such as mitomycin C results in *stx*-phage induction and cell lysis. It has been shown that the decrease in the culture optical density is a relevant qualitative measurement of prophage induction and *stx*-phage production (Muniesa *et al.*, 2003; Tyler *et al.*, 2004). Thus, to determine whether phages carrying different *stx*₂ variants were equally induced by mitomycin C, we first monitored bacterial growth. Mitomycin C was added to the cultures at *t*₀ when the bacterial concentration reached 10⁷ to 3 × 10⁷ c.f.u. ml⁻¹. On the basis of OD₆₀₀ three growth patterns were observed (Fig. 1). For the first group, which includes the majority of the strains, mitomycin C slightly slowed the growth, and lysis due to lysogenic induction became apparent around 3 h after addition of mitomycin C to the growth medium (Fig. 1a). An early lysis, beginning around 90 min after mitomycin C treatment, was representative of three strains, namely 87-307, 87-2927 and ED-76 (Fig. 1b). The growth of the third group of strains was insensitive or poorly sensitive to mitomycin C (Fig. 1c), indicating that production of phages was limited in these strains. Thus it appeared that all strains were not equally sensitive to mitomycin C. All except one of the strains harbouring only the *stx*₂ variant belonged to the first group, whereas isolates carrying other variants, alone or in combination, were distributed in the three sensitivity groups.

Without lysogenic induction, only the *stx*₂ and *stx*_{2c} variants are expressed

To investigate whether lysogenic induction by mitomycin C was associated with expression of the *stx*₂ variants, mRNA levels were measured using q-PCR. Since 3 h after mitomycin C addition the bacterial cells are just beginning to be lysed for most of the strains, it is possible to isolate *stx*₂ mRNAs at this time from a large population of cells. Therefore, for q-PCR experiments we chose to isolate mRNA from each strain 3 h after mitomycin C treatment and at the same time for non-induced cultures.

In the absence of mitomycin C, only *stx*₂ and *stx*_{2c} mRNAs were detected (Fig. 2). Indeed, basal *stx*₂ mRNA levels were significantly higher than variant-*stx*₂ mRNAs ($P < 0.001$), except for *stx*_{2c} mRNA in two strains, CHVi-I and NV95. It is noteworthy that these strains are the only two O157:H7 strains expressing *stx*_{2c}. No *stx*_{2c} mRNA was detected in the non-O157:H7 strains carrying this variant. However, the *stx*_{2c} variant in these strains was not classical as it showed the genotype associated with mucus-activatable activity. Among the seven strains expressing *stx*₂ only, two did not produce significant mRNA levels. These two strains (VTH-13 and CB6775) belong to non-O157:H7 serotypes, whereas four of the five strains expressing high mRNA levels are O157:H7 strains. In all six strains containing both *stx*₂ and *stx*_{2-vhb}, only *stx*₂ mRNA was detected.

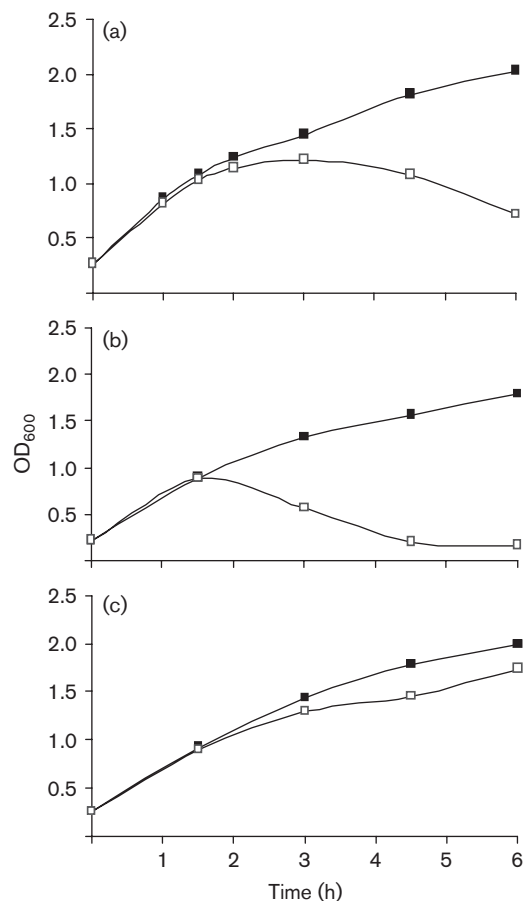


Fig. 1. Growth curves of STEC strains in the absence and presence of mitomycin C. At *t*₀, cultures in LB were divided into two parts, and mitomycin C (250 ng ml⁻¹) was added to one of them. ■, Growth in the absence of mitomycin C; □, growth in the presence of mitomycin C. (a) Growth curve of NV237 (*stx*₂), representative of *E. coli* Sakai (*stx*₂), EDL933 (*stx*₂), 86-24 (*stx*₂), 85-08 (*stx*₂), VTH-13 (*stx*₂), NV237 (*stx*₂), NV308 (*stx*_{2-vhb}), CHVi-I (*stx*_{2c}), NV95 (*stx*_{2c}), CL-3, CL-15 (*stx*₂-*stx*_{2-vhb}), NV254 (*stx*₂-*stx*_{2-vhb}), NV199 (*stx*_{2c}-*stx*_{2-vhb}) and B2F1 (*stx*_{2-vha}-*stx*_{2-vhb}). (b) Growth curve of *E. coli* 87-307 (*stx*₂-*stx*_{2-vhb}), representative of E-D76 (*stx*₂-*stx*_{2-vhb}) and 87-2927 (*stx*_{2-vha}-*stx*_{2-vhb}). (c) Growth curve of *E. coli* NV166 (*stx*_{2c}), representative of CB6775 (*stx*₂), NV148 (*stx*_{2-vha}), DEC16A (*stx*_{2-vhb}), E-D226 (*stx*_{2-vhb}), NV200 (*stx*₂-*stx*_{2-vhb}) and NV127 (*stx*_{2c}-*stx*_{2-vhb}).

Mitomycin C differentially induces the *stx*₂ variants

Expression of the *stx*₂ variants was differently affected by the mitomycin C treatment depending on the strain (Fig. 2). Globally, induced *stx*₂ mRNA levels were higher than the others ($P < 0.05$), except for the two O157:H7 strains, CHVi-I and NV95, that express *stx*_{2c} and the two strains that express *stx*_{2-vha} and *stx*_{2-vhb}. Transcription of *stx*₂ was stimulated 25- to 100-fold in all strains expressing *stx*₂ only, but when associated with *stx*_{2-vhb}, expression of *stx*₂ was inducible in only two of six strains. In the four

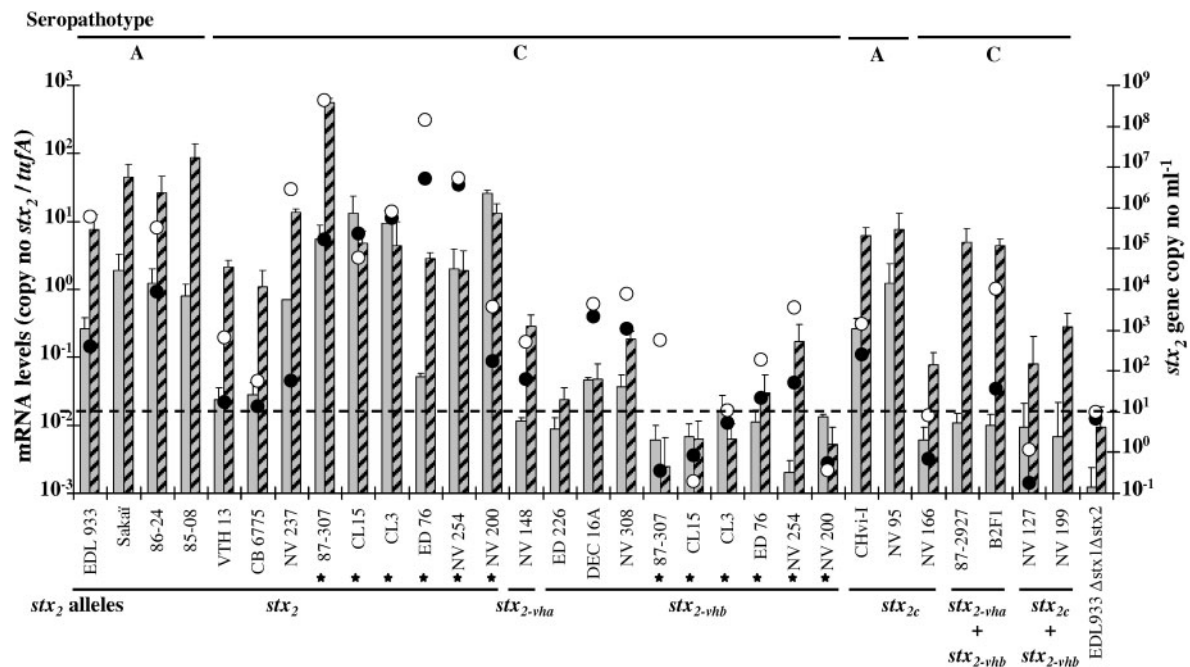


Fig. 2. Relative *stx*₂ and *stx*₂-related mRNA levels and indirect quantification of *stx*₂ and *stx*₂-related phage particles. Left scale: *stx*₂ relative mRNA levels were measured by q-PCR without mitomycin C (solid bars) or with mitomycin C induction (hatched bars). Values are the mean of at least three independent experiments done in triplicate. The standard error of the mean is indicated for each strain. Right scale: copy number of phage-borne *stx*₂ or *stx*₂-related genes in strain supernatants in the absence (●) or presence (○) of mitomycin C for 3 h. The seropathotype of the strains is indicated at the top. *stx*₂ variants indicated under the graph are the variants detected in the q-PCR experiments. The dashed line indicates values of the negative control. *Strains harbouring *stx*₂ + *stx*_{2-vhb} were tested separately for *stx*₂ and *stx*_{2-vhb}.

remaining strains *stx*₂ expression was as high in non-induced as in induced conditions. Three of them (CL-3, CL-15 and NV254) carry a non-classical *stx*₂ variant showing the RFLP pattern associated with mucus-activatable variants. Expression of some *stx*₂ variants was not induced by mitomycin C: *stx*_{2-vhb} mRNA was not produced or was produced at very low levels in all strains expressing *stx*_{2-vhb} either alone or in combination with *stx*₂. However, induction of the lytic cycle was earlier for three of these strains, 87-307, 87-2927 and ED-76 (Fig. 1b). To measure *stx*_{2-vhb} mRNA levels in these strains in a large population of cells, mRNAs were isolated at the beginning of cell lysis, 90 min after mitomycin C treatment. Again, *stx*_{2-vhb} mRNAs were undetectable. *stx*_{2-vha} and *stx*_{2c} mRNA increased 10- to 30-fold after lysogenic induction, reaching high levels in O157:H7 strains only. An increase in *stx*₂-related mRNA levels was also observed in strains expressing *stx*_{2-vhb} in combination with *stx*_{2-vha} or *stx*_{2c}. However, because our attempts to design a primer pair able to differentiate between these mRNAs were unsuccessful, we failed to determine whether expression of both genes or of only one was induced. It is noteworthy that the strains carrying the non-classical *stx*_{2c} variant expressed lower levels of *stx*₂-related mRNA than the strains carrying the classical *stx*_{2c} variant.

Analysis of the growth curves and *stx* mRNA levels showed that mitomycin C-induced cell lysis was associated with high expression of at least one of the *stx*₂ variants carried by the strain. Conversely, when treatment with mitomycin C did not result in cell lysis, the *stx*₂ variants were not or were very poorly expressed. These observations suggest that the *stx*₂ variants are expressed only when they are carried by an inducible prophage.

Only the *stx*₂ variants which are expressed are carried by released phage particles

To investigate whether the *stx*₂ variants are associated with phage DNA, we quantified *stx*-phage DNA in most culture supernatants by q-PCR using the same *stx*₂ and *stx*₂-related specific primers as used for mRNA analysis. Phage particles were harvested from strain supernatants 3 h (Fig. 2) and 6 h (data not shown) after addition of mitomycin C. *stx*-phage DNA was not detected or was detected at low levels in cultures in which no lysis occurred, at 3 h as well as 6 h after addition of mitomycin C. At *t*₃ without treatment, significant amounts of *stx*-phage DNA were only detected in supernatants of strains expressing the corresponding *stx* mRNA in significant amounts. Higher amounts of *stx*-phage DNA were detected under mitomycin C treatment

except for strains in which *stx*₂ transcription was not inducible (CL-15, CL-3 and NV254). Under mitomycin C induction, *stx*_{2-*vhb*}-phage DNA was detected in low amounts only in the supernatant of the three strains for which *stx*_{2-*vhb*} mRNA was detected (NV308, DEC16A and NV254) and, surprisingly, in the supernatant of strain 87-307. High *stx* mRNA levels were never observed in the absence of phage particles in the supernatant. The relationships observed between growth curve patterns, *stx* mRNA levels and *stx*-phage release indicate that the *stx* variants carried on prophages able to produce phage particles in the medium were the only ones expressed, and that the promoter of the *stx*_{2-*vhb*} variant, when it is not carried on such prophages (for example in CL-3, CL-15 and NV200), is inactive in the culture conditions used. In those strains in which expression of *stx*₂ was high but not sensitive to mitomycin C (CL-3, CL-15 and NV254), *stx*₂-phage DNA was detected at similar high levels with or without mitomycin C treatment. Thus it appears that the *stx*₂ prophages in these strains had an unusual level of spontaneous induction. At *t*₆, the amounts of *stx*-phage DNA were two- to fivefold higher than at *t*₃, but the relative amounts of each variant remained similar (data not shown).

To investigate whether *stx*₂ expression and *stx*₂-phage production are affected by nutritional cues, we measured *stx*₂ and *stx*₂-related mRNA and phage DNA when STEC

strains were grown under nutrient-limiting conditions, i.e. in DMEM medium containing a low glucose concentration (1 g l⁻¹). The data obtained in DMEM are presented as a supplementary figure with the online version of this paper (Fig. S2). They were not significantly different from data in LB. As in LB medium, we found that without induction, only the *stx*₂ and *stx*_{2c} variants were expressed. Under mitomycin C treatment, the same levels of mRNA induction as in LB medium were observed for each variant. The *stx*_{2-*vhb*} genes not expressed in LB remained unexpressed in DMEM. As in LB medium, *stx*-phage production was well correlated with *stx* mRNA.

Shiga toxin release

To confirm that Shiga toxin was synthesized by bacteria expressing the *stx*₂ and *stx*₂-related genes, amounts of Stx2 and Stx2-related variants released in culture supernatants were measured using ELISA (Fig. 3). As Stx2 variants are not immunologically distinct, the assay did not allow differentiation between Stx2, Stx2-*vha*, Stx2-*vhb* and Stx2c in the supernatant of strains producing two toxins. Thus differential production of each Stx2 variant could not be assessed by this method.

In non-induced conditions, concentrations of 30–800 ng ml⁻¹ of Stx2 were measured in the culture supernatants,

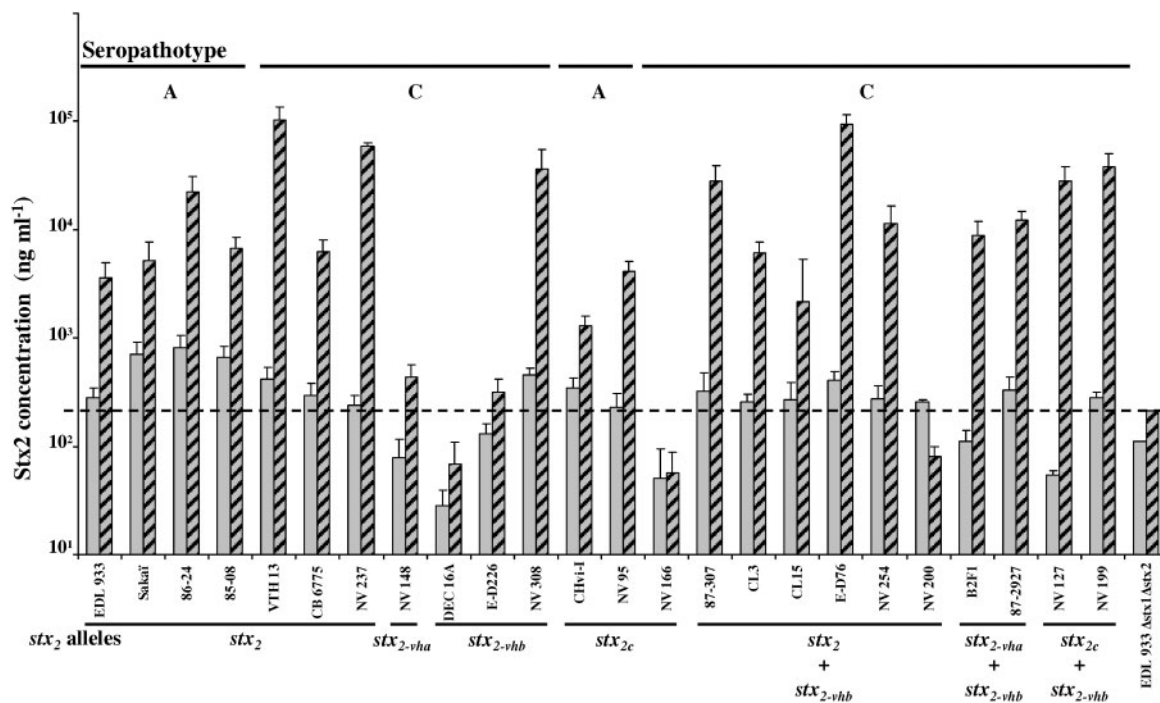


Fig. 3. Quantification of Stx2 concentration in strain supernatants. Solid bars, concentration reached without mitomycin C treatment; hatched bars, concentration reached under mitomycin C treatment. Values are the mean of at least three independent experiments done in duplicate. The standard error of the mean is indicated for each strain. The *stx*₂ variants carried by each strain are indicated at the bottom. The seropathotype of the strains is indicated above the bars. The dashed line indicates values of the negative control.

depending on the strain. Globally, human-derived strains released significantly higher amounts of Stx2 than bovine-derived strains ($P < 0.05$). Under mitomycin C treatment, toxin release was induced 10- to 140-fold, reaching 3000–100 000 ng ml⁻¹ in most (18 of 24) of the culture supernatants, and the difference in Stx2 release between human and bovine strains was no longer significant. The induction or absence of induction of toxin production correlated quite well with the induction or absence of induction of mRNA expression and phage particle release.

DISCUSSION

It has been suggested that the varied capacity of STEC strains to cause serious disease in humans is associated with the type and/or amount of Stx produced (Paton *et al.*, 1995). However, expression of stx₂ variants in STEC differing in their virulence traits is not well documented. In this study, we determined the distribution of stx₂ variants among 42 Stx2-producing STEC obtained from patients or from healthy cattle. Ten strains belong to seropathotype A, containing O157:H7 LEE-positive strains, which are the most frequently associated with severe outbreaks in the world (Karmali *et al.*, 2003). The remaining strains belong to seropathotype C, which includes mainly non-O157:H7 LEE-negative strains frequently associated with sporadic cases of HUS (Karmali *et al.*, 2003). Then a subset of 24 strains representative of the initial group with regard to the origin, serotype, and stx₂ variants was analysed for the induction by mitomycin C of stx₂ variant expression, Stx2 release and stx-phage particle production.

Heterogeneity of the stx₂ and stx₂-related genotypes

Molecular typing of the stx₂ and stx₂-related variants using previously described or new PCR-RFLP methods revealed mosaic sequences. First, a gene encoding an Stx2 B-subunit can be associated with an A-subunit gene that possesses the *Pst*I site indicative of mucus-activatable toxins. The same observation was made in a recent study on STEC strains isolated in Germany from food samples (Beutin *et al.*, 2007). Second, A-subunit genes primarily typed as stx_{2c} based on PCR-RFLP in their 5' end showed the PCR-RFLP type characteristic of mucus-activatable toxins in their 3' end. However this heterogeneity was not observed in O157:H7 strains, which all showed the non-activatable stx₂ and stx_{2c} genotype, nor for the stx_{2-vha} and stx_{2-vhb} genes, which all showed the activatable genotype.

Heterogeneous expression of stx₂ variants

Several authors have shown that Stx2-encoding prophages are highly variable (Johansen *et al.*, 2001) and present a high degree of heterogeneity in terms of induction levels (Muniesa *et al.*, 2004a; Wagner *et al.*, 1999). In agreement with these reports, we found that expression of stx₂ and

stx₂-related genes is heterogeneous in basal and in induced conditions, depending on the strain and on the stx₂ variant. q-PCR analysis of stx₂-related genes showed that stx₂ mRNA levels were higher than stx_{2-vha} or stx_{2-vhb} mRNA levels. However, a more detailed analysis showed a heterogeneous expression of a given stx₂ variant which correlated with a heterogeneous release of stx-phage particles depending on the strain. This could be due to different regulatory properties of the phages harbouring the same stx variant, or to bacterial host factors such as repair systems, membrane constitution, etc. For example, among nine strains harbouring stx_{2-vhb} alone or in combination with stx₂, stx_{2-vhb} mRNA and phage particles were detected in only three, although at low levels. In Stx2-producing strains, large differences appeared in stx₂-mRNA levels, in basal as well as in induced conditions. stx₂ genes highly expressed without mitomycin C treatment are probably carried by a prophage with a high level of spontaneous induction, leading to high release of phage particles and Stx independently of the SOS system. Previous studies indicate that the 933W prophage, encoding Stx2 in EDL933, induces more readily than lambdaoid prophages that do not encode Stx (Livny & Friedman, 2004). Here we broaden this observation to a number of other strains of different serotypes, showing that most of the prophages expressing the stx₂ variant show a high level of spontaneous induction whereas the stx_{2-vha}, stx_{2-vhb} and stx_{2c} variants associated with the mucus-activatable genotype are not or are poorly induced without mitomycin C treatment.

The stx_{2-vhb} variant is probably not associated with an inducible prophage

Upon mitomycin C treatment, stx₂, stx_{2-vha} and stx_{2c} transcription was induced, but stx_{2-vhb} transcription was induced in only two strains out of nine. This differential expression was also seen in strains expressing both stx₂ and stx_{2-vhb} in which high stx₂ and low stx_{2-vhb} mRNA levels were measured, in induced as well as in non-induced conditions. Thus, our results indicate that in most cases expression of stx_{2-vhb} is not induced upon treatment by mitomycin C, and suggest that in the corresponding strains this gene is not phage-borne, or is carried by a defective prophage. This conclusion is further supported by the absence of stx_{2-vhb}-phages in strain supernatants. Alternatively, in strains harbouring stx_{2-vhb} together with stx₂, stx_{2-vhb}-prophages could be induced later than stx₂-prophages. Thus induction of the lytic cycle of the stx₂-phage could lyse the cells before high stx_{2-vhb} mRNA levels have been produced. This could explain why low amounts of stx_{2-vhb}-phage DNA were detected in the supernatant of strain 87-307 under mitomycin C induction. However, other studies showed that some stx₂-related genes were not associated with an inducible prophage (Teel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), and that in strains harbouring two stx₂-prophages only one was inducible (Teel *et al.*, 2002; Muniesa *et al.*, 2003). In particular, using two B2F1

isogenic mutants, producing either Stx2-vha only or Stx2-vhb only, Teel *et al.* (2002) have provided evidence that *stx2-vha* expression is bacteriophage associated but *stx2-vhb* is not. In a study including 168 STEC strains, Muniesa *et al.* (2004b) found that 5 strains possessed two *stx2* copies. In each case, only one copy was found to be associated with an inducible prophage. A constitutive, poorly active promoter controlling *stx2* expression in O157 strains has been described (Sung *et al.*, 1990; Plunkett *et al.*, 1999). The very low levels of *stx2-vhb* mRNA detected in induced and non-induced conditions could indicate that this gene was expressed from such a poorly active specific promoter in the conditions tested.

In summary, our results strongly suggest that *stx2* and *stx2*-related genes are expressed only when they are carried by a prophage subject to a high spontaneous induction or/and to SOS-mediated lysogenic induction. In particular, the *stx2-vhb* genes are not or are very poorly expressed, in basal as well as in induced conditions, and in most cases are not found on the genome of phage particles in strain supernatants. Induction levels and amounts of *stx* mRNAs are significantly higher in O157:H7 strains than in strains belonging to the other serotypes ($P < 0.01$). Furthermore, *stx* mRNA levels were higher in strains belonging to seropathotype A and in the strains of seropathotype C that express the *stx2* variant when compared to other strains of seropathotype C.

Stx2 release

We found variable levels of Shiga toxins in supernatants of some STEC strains in LB medium without mitomycin C. This is probably due to spontaneous phage induction, since we detected toxins in the supernatants only when phage particles were also detected. This basal amount of released toxin varied from strain to strain, and was significantly higher in strains isolated from humans than in strains isolated from cattle. There were also marked differences in the effect of mitomycin C on toxin production by different strains, but, in contrast to the findings by Ritchie *et al.* (2003), we found no significant difference between human- and bovine-derived strains, in terms of amounts of released toxin or of induction levels. This discrepancy could be due to the choice of strains included in the study. All but one of the human-derived strains belonged to the highly virulent seropathotype A in the study reported by Ritchie *et al.* (2003), whereas half of our human-derived strains belong to the low-virulent seropathotype C.

For most of the strains, the amount of toxin released in the supernatant correlated well with the measured levels of *stx* mRNA, in basal and in induced conditions. However, this was not the case for some particular strains. Indeed, strains CL-3, CL-15 and NV254 each produced similar high levels of *stx2* mRNA and *stx2*-phage particles independently of the presence of mitomycin C. However, low amounts of toxin were produced without mitomycin C whereas high Stx2 amounts were produced under mitomycin C treatment;

strains NV308, NV127 and NV199 produced moderate levels of *stx* mRNA and *stx*-phage DNA under mitomycin C treatment, but released high amounts of toxin. Post-transcriptional regulation leading to a more efficient translation of *stx* mRNA in the presence of mitomycin C could explain these observations. In contrast, strain NV200 produced high levels of *stx2* mRNA, but did not release Stx2 into the medium, suggesting that *stx2* mRNA was not translated. Although further investigation is required to determine the molecular mechanisms involved, these observations highlight the functional diversity of *stx* phages.

Conclusion

Our results indicate that the *stx2* variant is mainly associated with the most pathogenic human-derived strains belonging to seropathotype A (O157:H7 strains). Furthermore, the data show a relationship between the seropathotype and the expression level of the *stx2* variant, and the amount of *stx*-phages and toxin released, in basal as well as in induced conditions. In seropathotype C, a subset of LEE-negative strains showed the same characteristics as the O157:H7 strains regarding *stx* expression and induction and thus could be a greater risk to human health than the other strains belonging to this seropathotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Valérie Livrelli (Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France), Jorge Blanco Alvarez (Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain), Alfredo Caprioli (Laboratorio di Medicina Veterinaria, Rome, Italy), Lothar Beutin (Robert Koch Institute, Berlin, Germany) and Thomas Whittam (National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, USA, STEC Center: <http://shigatox.net>) for generous gifts of STEC strains. We acknowledge Jean-François Martin for his invaluable help and advice on statistical analysis, Arthur Donohue-Rolfe for his technical advice regarding *stx*-phage quantification, Alexandra Durand for excellent technical assistance, and Thomas Hindré for helpful discussions.

REFERENCES

- Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H. & Wells, J. G. (2001). The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* **183**, 1063–1070.
- Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. & Martin, C. (2001). Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**, 3060–3065.
- Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. & Albrecht, N. (2007). Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4769–4775.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R. & Karch, H. (2006). Shiga toxin activatable by intestinal mucus in

- Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* **43**, 1160–1167.
- Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P. & Gyles, C. L. (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**, 497–503.
- Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M. & Strockbine, N. A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis* **192**, 1422–1429.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H. & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* **36**, 289–311.
- Dean-Nystrom, E. A., Melton-Celsa, A. R., Pohlenz, J. F., Moon, H. W. & O'Brien, A. D. (2003). Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* strains in neonatal pigs. *Infect Immun* **71**, 6526–6533.
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. & Karch, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**, 74–84.
- Fronhoffs, S., Totzke, G., Stier, S., Wernert, N., Rothe, M., Bruning, T., Koch, B., Sachinidis, A., Vetter, H. & other authors (2002). A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **16**, 99–110.
- Fuchs, S., Muhldorfer, I., Donohue-Rolfe, A., Kerenyi, M., Emody, L., Alexiev, R., Nenkov, P. & Hacker, J. (1999). Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb Pathog* **27**, 13–23.
- Gamage, S. D., Patton, A. K., Hanson, J. F. & Weiss, A. A. (2004). Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infect Immun* **72**, 7131–7139.
- Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**, 2573–2585.
- Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy-Rozand, C. & Martin, C. (2005). Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **43**, 6098–6107.
- Gobert, A. P., Varelle, M., Glasser, A.-L., Hindré, T., de Sablet, T. & Martin, C. (2007). Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF- κ B signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **178**, 8168–8174.
- Gobius, K. S., Higgs, G. M. & Desmarchelier, P. M. (2003). Presence of activatable Shiga toxin genotype (stx(2d)) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. *J Clin Microbiol* **41**, 3777–3783.
- Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y. & Nishibuchi, M. (1990). Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog* **8**, 47–60.
- Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D. & other authors (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* **188**, 719–729.
- Johansen, B. K., Wasteson, Y., Granum, P. E. & Brynestad, S. (2001). Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology* **147**, 1929–1936.
- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **151**, 775–782.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. & other authors (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* **41**, 4930–4940.
- Lindgren, S. W., Samuel, J. E., Schmitt, C. K. & O'Brien, A. D. (1994). The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* **62**, 623–631.
- Livny, J. & Friedman, D. I. (2004). Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol Microbiol* **51**, 1691–1704.
- Louise, C. B. & Obrig, T. G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**, 1397–1401.
- Melton-Celsa, A. R., Kokai-Kun, J. F. & O'Brien, A. D. (2002). Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A(2) peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol* **43**, 207–215.
- Muhldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G. T., Acheson, D. W., Tschape, H., Kane, A. V., Ritter, A., Olschlager, T. & Donohue-Rolfe, A. (1996). Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **64**, 495–502.
- Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Panella, H. & Jofre, J. (2003). Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun* **71**, 4554–4562.
- Muniesa, M., Blanco, J. E., De Simon, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A. R. & Jofre, J. (2004a). Diversity of stx₂ converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**, 2959–2971.
- Muniesa, M., Serra-Moreno, R. & Jofre, J. (2004b). Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environ Microbiol* **6**, 716–725.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142–201.
- O'Brien, A. O., Lively, T. A., Chen, M. E., Rothman, S. W. & Formal, S. B. (1983). *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**, 702.
- Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**, 450–479.
- Paton, A. W., Bourne, A. J., Manning, P. A. & Paton, J. C. (1995). Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect Immun* **63**, 2450–2458.
- Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D. & Lauwers, S. (1998). Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 3317–3322.
- Plunkett, G., III, Rose, D. J., Durfee, T. J. & Blattner, F. R. (1999). Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* **181**, 1767–1778.

- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. & Forestier, C. (2000).** Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* **38**, 1023–1031.
- Ritchie, J. M., Wagner, P. L., Acheson, D. W. & Waldor, M. K. (2003).** Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1059–1066.
- Schmitt, C. K., McKee, M. L. & O'Brien, A. D. (1991).** Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H– strain E32511. *Infect Immun* **59**, 1065–1073.
- Sung, L. M., Jackson, M. P., O'Brien, A. D. & Holmes, R. K. (1990).** Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6386–6395.
- Teel, L. D., Melton-Celsa, A. R., Schmitt, C. K. & O'Brien, A. D. (2002).** One of two copies of the gene for the activatable Shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage. *Infect Immun* **70**, 4282–4291.
- Tyler, J. S., Mills, M. J. & Friedman, D. I. (2004).** The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol* **186**, 7670–7679.
- Wagner, P. L., Acheson, D. W. & Waldor, M. K. (1999).** Isogenic lysogens of diverse Shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of Shiga toxin. *Infect Immun* **67**, 6710–6714.
- Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W., Waldor, M. K. & Friedman, D. I. (2001).** Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* **183**, 2081–2085.
- Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K. & Acheson, D. W. (2000).** Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**, 664–670.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Kuczius, T. & Karch, H. (2005).** Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 558–561.

Edited by: N. J. High

Figure supplémentaire 1

A

```

stx2-EDL933 GAGTCTCGA TGGCGGTCCA TTATCTGCAT TATGCGTGT TAGCTCAGCC GGACAGAGCA ATGTCCTTCT GAGCAATCGG
stx2-EDL933 TCACTGGTTC GAATCCAGTA CAACGCGCCA TATTTATTTA CCAGGCTCGC TTTTGCGGGC CTTTTTTATA TCTGCGCCGG
stx2-EDL933 GTCTGGTCT GATTACTTCA GCCAAAAGGA ACACCTGTAT ATGAAGTGTA TATTATTAA ATGGGTACTG TGCTGTTAC
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 TGGGTTTTTC TTCGGTATCC TATCCCCTGG AGTTTACGAT AGACTTTTCG ACCCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTAAAT
stx2-c ...C..... .A..... .T..... .A.....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 AGTATACGGA CAGAGGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG TCTGTTATTA ACCACACCCC
stx2-c .....
stx2-vha .C..... .A..... .T..... .G.....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 ACCGGGCAGT TATTTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT GTCTATCAGG CGCGTTTTGA CCATCTCGT CTGATTATTG
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb G.....

stx2-EDL933 AGCAAATAA TTTATATGTG GCCGGGTTTC TTAATACGGC AACAATACT TTCTACCGTT TTTAGATTT TACACATATA
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 TCAGTGCCCG GTGTGACAAC GGTTCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGCAA CGTGTGCGAG CGCTGGAACG
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 TTCGGAATG CAAATCAGTC GTCACACT GGTTCATCA TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 GAGATGCATC CAGAGCAGTT CTGCGTTTG TCACTGTAC AGCAGAAGCC TTACGCTTCA GGCAGATACA GAGAGAATTT
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 CGTCAGGCAC TGTCTGAAAC TGCTCCTGTG TATACGATGA CGCCGGGAGA CGTGGACCTC ACTCTGAACT GGGGGCGAAT
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 CAGCAATGTG CTCCGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGTG AGAGTGGGA GAATATCCTT TAATAATATA TCAGCGATAC
stx2-c .....
stx2-vha .....
stx2-vhb .....

stx2-EDL933 TGGGGACTGT GGCCGTATA CTGAATTGCC ATCATCAGGG GGCGGTTTCT GTTCGCGCCG TGAATGAAGA GAGTCAACCA
stx2-c .....
stx2-vha ...T.....
stx2-vhb ...T..... .G.....

stx2-EDL933 GAATGTCAGA TAACTGGCGA CAGGCCTGTT ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT AATACCAGCTG CAGCGTTTCT
stx2-c .....
stx2-vha .....C.....
stx2-vhb .....C.....

stx2-EDL933 GAACAGAAAG TCACAGTTTT TATATACAAC GGGTAAATAA
stx2-c .....
stx2-vha .....C..... .G.....
stx2-vhb .....A.....C..... .G.....
    
```

RFLP-PCR typing of *stx2-vha* and *stx2c*. A: Alignment of the nucleotide sequences of the genes encoding the A subunit of the *stx2* variants. The sequences corresponding to the primers used for the PCR-RFLP that discriminates *stx2-vha* from *stx2c* are in a box; the *EcoRV* restriction site is indicated. The *PstI* site used for typing of mucus-activatable variants is indicated.

B: PCR amplification results in a 529 bp fragment. The *stx2c* fragment is cleaved by *EcoRV*, yielding two fragments of 329 bp and 200 bp, whereas the *stx2-vha* fragment remains uncut upon digestion by *EcoRV*.

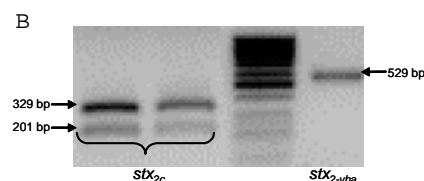
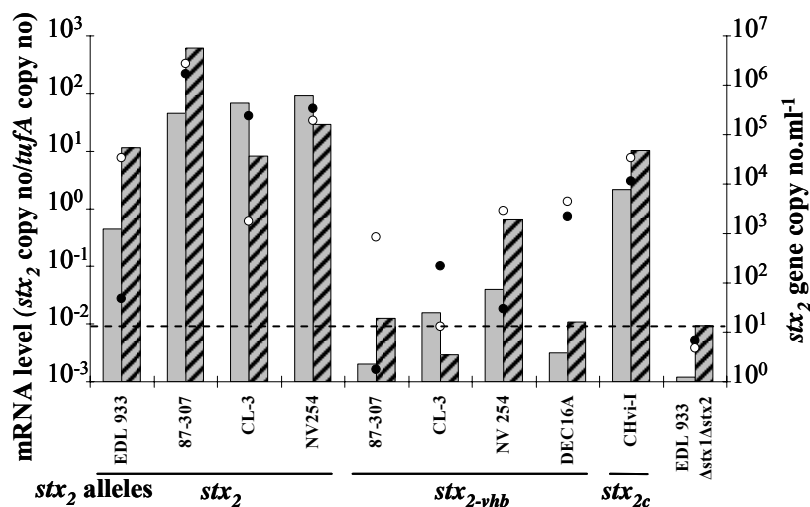


Figure supplémentaire 2



Relative *stx*₂ and *stx*₂-related mRNA levels and indirect quantification of *stx*₂ and *stx*₂-related phage particles in DMEM medium. Left scale: *stx*₂ relative mRNA levels were measured by q-PCR without mitomycin C (solid bars) or with mitomycin C induction (hatched bars). Average results from duplicate experiments are shown. Right scale: Copy number of phage-borne *stx*₂ or *stx*₂-related genes in strain supernatants in the absence (closed circles) or presence (open circles) of mitomycin C for 3 h. *stx*₂ variants indicated under the graph are the variants detected in the q-PCR experiments. Strains harboring *stx*₂+*stx*_{2-vhb} were tested separately for *stx*₂ and *stx*_{2-vhb}. The dotted line indicates values of the negative control.

**PUBLICATION N° 2: THE HUMAN MICROBIOTA INHIBIT
SHIGA-TOXIN SYNTHESIS BY ENTEROHEMORRHAGIC
*ESCHERICHIA COLI***

A soumettre

Thibaut de Sablet, Christophe Chassard, Annick Bernalier-Donadille, Marjolaine Vareille,
Alain P. Gobert & Christine Martin*

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR454 Unité de Microbiologie,
Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Corresponding author: Christine Martin, Unité de Microbiologie, INRA, Centre de Theix,
63122 Saint-Genès-Champanelle, France. Tel: 33-4-73-62-42-47. Fax: 33-4-73-62-45-81.
Email: cmartin@clermont.inra.fr

Manuscript information: 14 text pages, 4 figures, and 1 table.

Word and character counts: 235 words in the abstract; 38334 characters in the paper.

Abbreviations: EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; GFC, germ-free content;
HMC, human microbiota content; QS, quorum sensing; Stx, Shiga-toxin;

Escherichia coli O157:H7 is a foodborne pathogen causing hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, especially in children. The main virulence factor responsible for the more serious disease is the Shiga-toxin 2 (Stx2) which is released in the gut after oral ingestion of the organism. Although it is largely accepted that the amount of Stx2 produced by *E. coli* O157:H7 in the gut is critical for the development of disease, the eukaryotic or prokaryotic gut factors that modulate Stx2 synthesis are largely unknown. In this study we examined the influence of prokaryotic molecules produced by a complex human microbiota on Stx2 synthesis by *E. coli* O157:H7. Using the caecal content of gnotobiotic rats colonized by human microbiota or a conditioned medium having supported the growth of a complex human microbiota, we show that extracellular prokaryotic molecules produced by the commensal microbiota repress *stx2* mRNA expression and Stx2 production by repressing the spontaneous and induced lytic cycle mediated by RecA. These molecules, with molecular mass below 3 kDa, are produced in part by *Bacteroides thetaiotaomicron*, a predominant species of the normal human intestinal microbiota. The microbiota-induced *stx2* repression is independent of the known quorum-sensing pathways described in *E. coli* O157:H7 involving SdiA, QseA, QseC, or the autoinductor 3. Our findings demonstrate for the first time the regulatory activity of a soluble factor produced by the human digestive microbiota on a virulence factor in a physiologically relevant context.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 causes foodborne disease ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis and life-threatening complications such as the haemolytic-uremic syndrome (HUS). Shiga toxin (Stx), an AB₅ toxin, is the major virulence factor of *E. coli* O157:H7, and is responsible for the more severe symptoms of the infection. The A subunit has N-glycosidase activity that cleaves a specific adenine in the host cell rRNA, leading to protein synthesis inhibition and ultimately to cell death. The B subunits are required for toxin binding to its eukaryotic cellular receptor, the globotriaosylceramide-3. EHEC O157:H7 can produce one or both of two antigenically distinct forms of Stx: Stx1 and Stx2. Epidemiological studies, together with *in vivo* and *in vitro* experiments, have revealed that Stx2 is the most important virulence factor associated with severe human disease. Indeed, Stx2 is 1,000 times more cytotoxic than Stx1 to human renal endothelial cells and STEC producing Stx2 are more commonly associated with serious diseases than isolates producing Stx1 or Stx1 plus Stx2 (1, 2).

The genes encoding the two subunits of Stx are located in the genomes of lambdoid bacteriophages and their expression is under the control of the late phage promoter pR' (3). In lysogens, expression of phage genes is repressed by the cI repressor. However, low levels of spontaneous phage induction can occur. It has been shown that most of Stx2 prophages induce spontaneously more readily than lambdoid prophages that do not encode Stx (4, 5). DNA damaging agents or inhibition of DNA replication activates the bacterial SOS response, which mediates cleavage of the repressor cI of lambda bacteriophages by activated RecA, leading to induction of the phage lytic cycle. Induction of Stx prophages leads in turn to an increase in Stx production and to host cell lysis; consequently Stx is released into the environment.

Epidemiological observations and animal models suggest that the severity of the disease is correlated to the amount of Stx produced in the gut during infection (6-8). Environmental and/or biological factors that may influence Stx production *in vivo* can thus modulate the development of hemorrhagic cases. In this view, we recently demonstrated that human epithelial cell-derived nitric oxide inhibits EHEC *stx* mRNA expression and Stx synthesis. It has been shown that *E. coli* O157:H7 growth is suppressed in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota (9). Thus, commensal bacteria may influence Stx concentration in the gut by inhibiting EHEC growth. Probiotic *Bifidobacteria* inhibited mitomycin C-induced Stx production in the streptomycin-treated mouse model of EHEC infection without inhibiting EHEC growth, by concomitantly decreasing the pH and increasing acetate concentration (10). The underlying molecular mechanism was not

characterized, and could involve a molecular cross-talk through or independently of the quorum sensing. In contrast, DNase colicins produced by the colicinogenic microbiota may enhance Stx2 synthesis by inducing the SOS response in EHEC (11). However, the effect of a complex human microbiota on *stx* gene expression at the transcriptional level has not yet been investigated.

Thus, in this study we investigated the influence of prokaryotic molecules produced by a complex human microbiota on Stx2 synthesis by *E. coli* O157:H7. Using the caecum content of human microbiota-associated rats as a culture medium for *E. coli* O157:H7, we demonstrate that Stx2 synthesis is repressed at the transcriptional level by a soluble factor produced in particular by *Bacteroides thetaiotaomicron*. This repression is effective in the context of a physiological digestive environment and overcomes the probable activation of Stx2 synthesis exerted by host eukaryotic factors, even under exposure to inducing antibiotics. These findings underscore the importance of the digestive microbiota on the expression of virulence traits by EHEC and therefore on the protection afforded against severe disease such as HUS.

Results

Human faecal microbiota inhibit Stx2 synthesis. The medium of Leedle and Hespell (12) supports growth of the complex human microbiota by maintaining high bacterial diversity (13). Conditioned Leedle and Hespell media were prepared by growing for 24 h the faecal microbiota obtained from four different individuals before removing bacteria by centrifugation and filtration, then adjusting the pH to 7 and adding 0.2 % glucose. Growth of *E. coli* O157:H7 was slowed in conditioned media as compared to the non-conditioned medium, but after prolonged incubation, OD₆₀₀ readings in conditioned and non-conditioned media were similar (Fig. 1a). A significant decrease in *stx2* mRNA level and Stx2 concentration was observed in all four conditioned media at 6 h and 24 h after the beginning of culture (Fig. 1b and 1c). This decrease was also observed when Stx2 levels were calculated per OD unit and thus was not due to the lower number of *E. coli* cells in the conditioned media (data not shown).

To establish whether antibiotic-induced Stx2 synthesis was also inhibited in the conditioned medium, we induced the SOS response using the quinolone antibiotic ciprofloxacin. We used a range of ciprofloxacin concentrations between 25 and 100 ng ml⁻¹ and found that 25 ng ml⁻¹ was sufficient to induce the SOS response (data not shown). Therefore this concentration was used in further experiments. Stx2 synthesis increased

dramatically under ciprofloxacin treatment, although to a lesser extent in the conditioned than in the non-conditioned medium (Fig. 2a). RecA is a reliable marker of the SOS response that upon activation induces self-cleavage of the phage repressor cI (14) and of the *recA* gene repressor LexA (15). We thus analyzed *recA* mRNA expression in conditioned and non-conditioned media, under exposure to ciprofloxacin and without ciprofloxacin treatment. As expected, transcription of *recA* was induced under ciprofloxacin exposure in both media (Fig. 2b and 2c). However, *recA* induction was lower in the conditioned than in the unconditioned media, both in the absence and in the presence of ciprofloxacin (Fig. 2b and 2c), suggesting that the down-regulation of Stx2 synthesis in the conditioned media is consecutive to the inhibition of RecA activation.

***Bacteroides thetaiotaomicron* inhibits Stx2 synthesis.** To characterize which bacterial species are mostly responsible for Stx2 synthesis inhibition, we conditioned the medium with pure cultures of species belonging to the three major phyla representing the human intestinal microbiota (Table 1). Stx2 production was measured after 6 h and 24 h of *E. coli* O157:H7 growth in media conditioned each with *Bacteroides* spp., *Roseburia faecis*, *Ruminococcus callidus*, *Lactobacillus reuteri*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*, and *Bifidobacterium breve*, either in monocultures or in bi- or tri-associations. The medium conditioned with *B. thetaiotaomicron* slowed *E. coli* O157:H7 growth, as did the medium conditioned with the total microflora, and inhibited Stx2 synthesis by 70% as compared to the non-conditioned medium, after 24 h of *E. coli* O157:H7 growth (Table 1). Media conditioned with *R. callidus*, *L. reuteri* or *C. leptum* also inhibited Stx2 synthesis, but to a lesser extent (30% to 50%), and only at 24 h; media conditioned with *B. thetaiotaomicron* in association with any one or two other species also inhibited Stx2 synthesis at 6 h and 24 h.

As a first step to characterize the inhibitory factor, an approximate molecular weight was determined. The medium conditioned with *B. thetaiotaomicron* and the non-conditioned medium were subjected to ultrafiltration using filters of varying molecular size cutoffs. The resulting filtrates were then examined for their inhibitory activity on Stx2 synthesis by using them to grow *E. coli* O157:H7 for 6 h and 24 h followed by Stx2 measurement. The filtrates obtained from the conditioned medium with the smallest molecular size cutoffs of 3 kDa resulted in retention of the inhibitory activity, whereas no inhibitory activity was observed with filtrates obtained from the non-conditioned medium (data not shown).

Known quorum sensing systems are not involved in Stx2 synthesis inhibition. Although controversial, previous studies have suggested that quorum sensing (QS) may

control *stx2* expression through AI-3 and epinephrine (16-20). QseC is the *E. coli* O157:H7 sensor kinase of the QseBC two-component system responding to AI-3 and epinephrine (21). QseA is involved in another QS pathway. Transcription of *qseA* is down-regulated in a *luxS* mutant, and induced by epinephrine (22). By using the AI-3 reporter strain TEVS232, AI-3 was not detected in the media conditioned by *B. thetaiotaomicron*. However, the QseA and QseBC QS pathways could respond to an as yet unidentified inductor. Therefore, to determine whether these signaling pathways are involved in Stx2 synthesis inhibition by the human faecal microbiota, we analyzed Stx2 synthesis in *qseC* and *qseA* mutants in media conditioned by different human faecal microbiota. Stx2 synthesis was inhibited to an equal degree in the mutants as in the wild-type strain (data not shown), indicating that the repressing molecule does not act through the QseBC or the QseA signaling pathways. Indole is a bacterial signal molecule that attenuates EHEC motility, biofilm formation, and adherence to HeLa cells (20). It has been shown that in non-pathogenic *E. coli*, indole signals through the AHL sensor SdiA (23). Therefore, we analyzed Stx2 synthesis in an *sdiA* mutant in media conditioned by different human faecal microbiota. Furthermore, we grew EDL933 in DMEM in the presence of 1 mM indole and measured *stx2* mRNA and Stx2 synthesis at 3 h, 6h and 24 h of treatment. Stx2 synthesis was still inhibited in the *sdiA* mutant and was not affected by indole in the DMEM medium (data not shown), suggesting that indole signaling is not involved in the repression of Stx2 synthesis. This is in agreement with a recent DNA microarray analysis of surface-associated EHEC, in which *stx* genes did not demonstrate any significant changes in expression upon exposure to indole (20). In conclusion, the QS pathways that have been described in EHEC O157:H7, involving QseA, QseBC, or SdiA, are not involved in Stx2 synthesis inhibition by the human microbiota-secreted molecules.

Stx2 synthesis is down-regulated in the caecum content of human microbiota-associated rats. We then wanted to determine whether the repressive effect of the human microbiota on Stx2 synthesis also occurs *in vivo* in the digestive content by using human microbiota-associated versus germ-free rats. We reasoned that host eukaryotic factors present in the digestive tract but absent in the Leedle and Hespell medium, such as intestinal hormones, biliary salts, or various metabolites, could increase Stx2 synthesis by *E. coli* O157:H7 and bypass the repression exerted by the microbiota. Eight germ-free rats were orally inoculated with an adult human faecal microbiota, and eight others with a child (age 3) faecal microbiota. Seven days later, faecal strict anaerobes, facultative anaerobes and enterobacteriaceae were numerated to check for colonization (Fig. 3a). The level of each

population was similar to the normal population levels of human faeces, indicating successful colonization of the rat digestive tract by the complex human microbiota, as previously described (24). We did not directly inoculate the rats with *E. coli* O157:H7 because it is known that EHEC colonizes the gut of conventional rodents to a much lower extent than the gut of germ-free or streptomycin-treated rodents (25, 26). Therefore, a difference in Stx2 concentration in faeces or in the gut could be due to a difference in colonization and not to a repression of Stx2 synthesis. Thus, we harvested the caecal content of the rats seven days later for *in vitro* *E. coli* O157:H7 growth, after removal of the autochthonous microbiota (human microbiota content medium, HMC). Caecum contents of germ-free rats were used as control medium (germ-free content medium, GFC). *E. coli* O157:H7 growth was similar in GFC and HMC media (Fig. 3b), with bacterial counts reaching approximately 10^9 CFU.ml⁻¹ after 24 h. Stx2 production was decreased by 70% and 96% in the media obtained with the adult and the child flora when compared to the caecal content of germ-free rats, respectively (Fig. 4a). Similarly, quantification of *stx2* mRNA using quantitative real-time PCR showed a decrease in the expression of this gene in the HMC medium (Fig. 4b). Interestingly, Stx2 synthesis was much higher in the caecum content of germ-free rats than in the unconditioned medium of Leedle and Hespell (compare figures 1 and 4), suggesting that eukaryotic host factors increase Stx2 synthesis, although factors produced by the human microbiota overcome this induction.

Discussion

It is well known that a number of bacterial strains of microbiota origin exert antibacterial effects against intestinal pathogens by producing molecules such as colicins, microcins, lantibiotics, or other uncharacterized antimicrobial components. These molecules usually inhibit the growth of bacterial pathogens by damaging the cell membranes (27). Recently, it has been shown that pure DNase colicins or co-culture of EHEC with colicinogenic strains increase Stx2 production by inducing the SOS response (11). However, the human intestinal tract is colonized by approximately 10^{14} commensal bacteria consisting of more than 1,000 different intestinal species, in which enterobacteriaceae do not represent more than 0.2% of the total bacterial number (28). Whether colicins are effective *in vivo* when the producers are part of this complex microbiota is not known. In another study, uncharacterized molecules produced by *Lactobacillus* strains affected the functionality of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium flagella, but not expression of the gene encoding flagellin (27). Indeed, the influence of molecules secreted by the human digestive microbiota on transcriptional regulation of virulence factors is not well documented. A recent study

demonstrates that the probiotic *L. acidophilus* strain La-5 secretes in laboratory media an uncharacterized molecule that either acts as a QS signal inhibitor or directly interacts with bacterial transcriptional regulators, controlling the transcription of EHEC genes involved in colonization (29). However, there is no evidence that this molecule is produced in the digestive content within a complex human microbiota and is active in physiological conditions. The results presented in this study demonstrate that soluble factors produced by the complex human fecal microbiota in a digestive environment inhibit Stx2 synthesis at the transcriptional level by inhibiting the EHEC SOS response mediated by RecA. It is of particular interest that the spontaneous as well as the ciprofloxacin-induced activation of RecA and release of Stx2 were inhibited in the human fecal microbiota-conditioned media. Furthermore, we have identified some members of the human microbiota able to contribute to the inhibition of Stx2 production. They belong to the major genera such as *Clostridium*, *Ruminococcus* or *Bacteroides*. *Bacteroides* genus represents one of the most important taxonomic groups in the gut and accounts for 10 to 30% of the total population (30). Among this community, *B. thetaiotaomicron* seems to be one of the most efficient bacteria tested in this study, demonstrating a strong ability to inhibit Stx2 production. *B. thetaiotaomicron* is a predominant commensal gut bacterium harbored by a large part of the population (31). This bacterium has already demonstrated beneficial activities for the host through polysaccharide breakdown (32) and attenuation of inflammation (33). *B. thetaiotaomicron* is also involved in several important intestinal functions such as mucosal barrier fortification and postnatal intestinal maturation (34). However, no impact of *B. thetaiotaomicron* on Stx production was reported until this study. Furthermore, the inhibitory effect of *B. thetaiotaomicron* on Stx2 production was increased in co-culture with some other intestinal strains. However, some individual strains seem to increase Stx2 production, although the global effect of the complex microbiota is Stx2 synthesis inhibition. Disruption or imbalance in the normal gut microbiota could therefore greatly affect this protective effect, while atypical microbiota could lead to greater sensitivity during EHEC infection. It will be especially interesting to investigate the human microbiota composition of individuals affected by EHEC infection.

Quorum-sensing molecules could influence EHEC virulence gene expression *in vivo*. Sperandio *et al.* showed that human faecal filtrates produce the AI-2 and AI-3 autoinducers involved in QS signaling used for interspecies communication (22). AI-2 is a furanosyl borate diester, and the enzyme responsible for its synthesis is encoded by the *luxS* gene. The LuxS enzyme is also involved, although indirectly, in the synthesis of AI-3 (35). AI-3 binds to the sensor kinase QseC, leading to transcriptional activation of the flagella regulon (21).

Expression of genes encoded on the locus of enterocyte effacement are also activated by quorum sensing through the transcriptional regulator QseA (36, 37). However, the influence of quorum sensing mediated by LuxS on Stx2 synthesis *in vitro* is controversial: wild-type *E. coli* O157:H7 strains produce more Stx2 than isogenic *luxS* mutants (16, 18), but *stx2* transcription was shown to be higher in the wild-type strain than in the *luxS* mutant in one study (16) and unchanged in another (17). However, in the latter case, addition of AI-2 or AI-3 to the *luxS* mutant cultures repressed *stx2* expression. In animal experiments using germ-free mice, there were no differences between the *luxS* mutant and the wild type concerning the number of bacteria in faeces, Stx production, and the lethality in mice, indicating that AI-2 and AI-3 do not contribute to full expression of Stx in this *in vivo* model (18). In agreement with these *in vivo* data, we found that AI-2 and AI-3 are likely not involved in microbiota-mediated Stx2 synthesis inhibition, since it was still observed in *qseA* and *qseC* mutants. Furthermore, AI-3 was not detected in the medium conditioned by *B. thetaiotaomicron* using the reporter strain TEVS232. Moreover, the other QS pathway described in EHEC, responding to HSLs or indole via SdiA, is not involved since the microbiota-mediated Stx2 inhibition was still observed in the *sdiA* mutant.

Eukaryotic molecules present in the gut also have an influence on Stx production *in vitro*. We have recently shown that nitric oxide, a free radical produced by activated intestinal cells, inhibits *stx2* mRNA expression and Stx2 synthesis by suppressing the SOS response induced by DNA damaging agents (38). However, the NO concentrations measured in the conditioned Leedle and Hespell media were too low (~ 20 μ M) to account for the inhibition of Stx2 synthesis in these media. The influence on Stx2 production of the gut catecholamines norepinephrine and epinephrine produced by adrenergic neurons is controversial. Sperandio *et al.* showed that norepinephrine and epinephrine can bind to QseC and substitute for AI-3 to activate *in vitro* transcription of EHEC genes involved in adhesion and in flagella biogenesis, suggesting that norepinephrine, epinephrine, and AI-3 may use the same signaling pathway (21, 22, 39). Norepinephrine has been shown to increase Stx production by *E. coli* O157:H7 independently of any nutritional aspect (40, 41). In contrast, a recent study showed that epinephrine decreases *stx2* expression in a *luxS* mutant (17), whereas a DNA microarray analysis of surface-associated *E. coli* O157:H7 failed to show any significant change in *stx2* expression upon treatment with epinephrine and norepinephrine (20). Involvement of epinephrine and norepinephrine on inhibition of Stx2 in our study is unlikely, since this inhibition was observed in the Leedle and Hespell medium which does not contain these molecules and in the *qseA* and *qseC* mutants. Furthermore, higher *stx2* mRNA levels and

higher Stx2 release were observed in the caecum contents of rats than in the Leedle and Hespell medium. We propose that host gut factors (possibly norepinephrine) stimulate *stx2* expression, and unidentified compounds produced directly or indirectly by the microbiota alleviate this activation and further repress *stx2* expression. Indeed, specific eukaryotic or prokaryotic factors assayed individually in laboratory media may demonstrate a stimulating or a repressing effect on Stx2 synthesis, but this effect may be overcome when the compound is combined with all other metabolites or signal molecules produced by the microbiota.

In this study we demonstrate, using a gut-derived biologically relevant medium, that a complex human microbiota exerts global negative control on Stx2 release. Therefore, the normal microbiota of healthy people, in addition to its known antimicrobial activities, also has the capacity to repress the expression of one of the most critical virulence factors of EHEC. In addition, using streptomycin-treated mice, it has been reported that *stx* genes can be horizontally transferred by *stx*-phages to phage-susceptible commensal *E. coli*, which in turn can produce Stx2 and may participate in the pathogenesis of haemolytic syndromes (42, 43). By inhibiting the SOS response and thus the lytic induction of *stx*-phages, the microbiota of healthy people may exert a collaterally protective effect by reducing the propagation of *stx*-phages and thus Stx2 release in the gut. In addition, Stx2 increases adherence to intestinal epithelial cells (44). Therefore, by inhibiting Stx2 synthesis the microbiota could limit EHEC colonization of the human gut. It is tempting to speculate that children having some perturbation of their microbiota could present a higher susceptibility to EHEC infection and are at greater risk for developing a HUS.

Materials and methods

Bacterial strains. WT EHEC (strain EDL933) and two isogenic mutants (strains EDL933 Δ *qseC* and EDL933 Δ *qseA*) were used in this study. These two mutants were obtained by using the one-step PCR-based method of Datsenko and Wanner (45), slightly modified as previously described (38). Bacterial species tested for their Stx2-inhibiting properties are listed in Table 1. The *E. coli* strain TEVS232 used for the AI-3 assay was kindly provided by V. Sperandio (46).

Faecal samples. Faecal samples from four healthy subjects (2 males and 2 females, aged 3-36), were used in this study. All subjects consumed a standard Western diet, did not receive antibiotics during the 3 months preceding the study and had no previously diagnosed gastrointestinal disease. Freshly voided feces were obtained from all subjects, stored at 4°C

under anaerobic conditions (anaerocult; Merck, Darmstadt, Germany) and processed within 12 h. One gram of collected fecal sample was diluted 10-fold (wet weight/volume) in an anaerobic mineral solution containing (in grams/liter): NaCl, 5; glucose, 2; cysteine-HCl, 0.3 and homogenized by magnetic stirring. Serial 10-fold dilutions in anaerobic solution down to 10^{-5} were then carried out.

Conditioned Leedle and Hespell media. 10^{-4} and 10^{-5} dilutions of each fecal flora were inoculated in the medium of Leedle and Hespell (12). After growth for 24 h at 37°C under anaerobic conditions (100% CO_2 in gas phase) using Hungate technique (47), the cultures were centrifuged for 30 min. at $7000 \times g$ and the supernatants were filtered through $0.2 \mu\text{m}$ filters. Nutrients were adjusted by the addition of 20X LB medium to a final concentration of 0.5X. pH was adjusted to 7 by the addition of 10N NaOH and the medium was then filtered ($0.2 \mu\text{m}$) to ensure sterility. This conditioned medium and the unconditioned medium were used for *in vitro* growth of *E. coli* EDL933 at 37°C under agitation (225 rpm). The medium was also conditioned with fecal bacterial strains in pure culture or in association with one or two other strains. Each species was grown separately under anaerobiosis for 24 h, and then 1 ml of one, two or three cultures was used to inoculate 40 ml of fresh medium. After incubation for 24 h at 37°C under anaerobiosis, these conditioned media were centrifuged for 30 min. at $7000 \times g$ and the supernatants were filtered through $0.2 \mu\text{m}$ filters. Nutrients were adjusted by the addition of 20X LB medium to a final concentration of 0.5X. pH was adjusted to 7 by the addition of NaOH and the medium was then filtered ($0.2 \mu\text{m}$).

Human microbiota-associated rats. Twenty-four adult male Fisher 344 rats provided by the breeding facilities of the Unit on Ecology and Physiology of the Digestive Tract of INRA (Jouy-en-Josas, France) were used. They were born germ-free and bred in germ-free conditions. Rats were aged 12 weeks at the start of the experiment. They were randomly separated into three groups of 8 animals in three sterile isolators. Within each isolator, rats were kept in pairs in standard macrolon cages containing a bed of wood shavings. They were given free access to UHT water and a pelleted semi-synthetic diet (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) sterilized by γ irradiation at 40 kGy (IBA Mediris, Fleurus, Belgium). To reproduce the diversity of a human-type diet, the food contained lipids and proteins of animal and plant origins, sucrose and cooked starch (24). Throughout the study, isolators were maintained in controlled conditions of light (8 AM-7 PM), temperature ($20-22^{\circ}\text{C}$) and humidity (45-55%). Fresh dilution (10^{-3}) of the fecal flora from the two healthy

males (age 36 and 3) were transferred to the isolators and given to rats using a sterile stainless-steel stomach feeding tube (1 ml per rat) to obtain two groups of 8 rats, colonized with each microbiota. The last group of 8 rats was inoculated with 1 ml of anaerobic mineral solution and used as a control. The rats were bred for 2 weeks to allow the microbiota to settle in the digestive tract and the rat physiology to adapt to the new bacterial status. On day 15, the human microbiota-associated rats and the germ-free rats used as control were sacrificed by CO₂ inhalation and the caecum was removed. Total anaerobes harbored in caecal contents were enumerated by the most probable number estimation (MPN). Caecal contents from each group were then pooled and centrifuged for 30 min. at 7000 x g. Supernatants were withdrawn and filtered through a 0.2 µm filter. The filtrates were half-diluted in mineral solution and glucose was added to a final concentration of 0.2%; pH was adjusted to 7 by the addition of 10N NaOH. The media (Human Microbiota-Associated Contents, HMC, and Germ-Free Content, GFC) were then filtered (0.2 µm) and used as culture media for the EDL933 strain.

***E. coli* growth conditions.** Overnight *E. coli* O157:H7 cultures in M9 medium supplemented with 0.2% glucose were diluted to a final OD_{600nm} of 0.02 in GFC and HMC media and incubated at 37°C under agitation (225 rpm). EHEC growth was monitored by numeration on LB plates after appropriate serial dilutions. Samples were collected at different times as indicated for Stx2 and mRNA quantification. Overnight *E. coli* O157:H7 cultures in the unconditioned Leedle and Hespell medium were diluted to a final OD_{600nm} reading of 0.02 in unconditioned and conditioned media. EHEC growth was monitored by OD_{600nm} measurement. Samples were collected at different times as indicated for Stx2 and mRNA quantification.

Stx2 measurement, and *stx2* and *recA* mRNA quantification. Amounts of Stx2 were quantified in culture supernatants using enzyme-linked Immunoassay (ELISA) as previously described (5). Total mRNAs were extracted as described (5). *stx2* and *recA* mRNA quantifications were performed using real-time PCR as previously described (5, 38). Results are shown as ratio of the *stx2* or *recA* copy number / *tufA* copy number.

AI-3 assay. AI-3 was assayed using the AI-3 reporter strain TEVS232 carrying a LEE1-*lacZ* fusion (22). Briefly, overnight culture of TEVS232 in LB was diluted 200-fold in low glucose DMEM (Invitrogen ref. 1880) containing 40 mM glutamine supplemented with 10,

25 or 50% conditioned and non-conditioned Leedle and Hespell media and grown at 37°C under agitation (225 rpm). When OD_{600nm} readings reached 0.1, cultures were diluted 1:5 and 1:10 in Z buffer and assayed for β-galactosidase activity by using *o*-nitrophenyl β-d-galactopyranoside (ONPG) as a substrate (48).

Statistical analysis. Student's t-test was used to determine significant differences between two groups. ANOVA with the Student-Newman-Keuls test was used to analyze significant differences among multiple test groups. In both cases, $P \leq 0.05$ was considered significant.

Footnotes

*To whom correspondence should be addressed. Email: cmartin@clermont.inra.fr

Acknowledgements

We thank A. Durand and A. Garrivier for their excellent technical assistance in real-time PCR and ELISA and V. Sperandio for the gift of the TEVS232 strain.

1. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**: 497-503.
2. Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev* **11**: 450-479.
3. Wagner PL, Neely MN, Zhang X, Acheson DW, Waldor MK, Friedman DI (2001) Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* **183**: 2081-2085.
4. Livny J, Friedman DI (2004) Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol Microbiol* **51**: 1691-1704.
5. de Sablet, T. , Bertin, Y., Varelle, M., Girardeau, J.P., Garrivier, A., Gobert, A.P., and Martin, C. (2008) Differential expression of *stx*₂ variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology* **254**: 176-186.
6. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**: 664-670.
7. Dean-Nystrom EA, Melton-Celsa AR, Pohlenz JF, Moon HW , O'Brien AD (2003) Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E coli* strains in neonatal pigs. *Infect Immun* **71**: 6526-6533.
8. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* **342**: 1930-1936.
9. Momose Y, Hirayama K, Itoh K (2008) Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. *Antonie Leeuwenhoek* **93**:141-149.
10. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y (2004) Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**: 2240-2247.
11. Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y (2007) Enhancement of Shiga toxin Production in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O157:H7 by DNase Colicins. *Appl Environ Microbiol*.
12. Leedle JA, Hespell RB (1980) Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial

- populations. *Appl Environ Microbiol* **39**: 709-719.
13. Chassard C, Goumy V, Leclerc M, Del'homme C, Bernalier-Donadille A (2007) Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 121-131.
 14. Koudelka AP, Hufnagel LA, Koudelka GB (2004) Purification and characterization of the repressor of the shiga toxin-encoding bacteriophage 933W: DNA binding, gene regulation, and autocleavage. *J Bacteriol* **186**: 7659-7669.
 15. Little JW, Edmiston SH, Pacelli LZ, Mount DW (1980) Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** : 3225-3229.
 16. Sperandio, V., Torres, A. G., Giron, J. A., and Kaper, J. B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *J Bacteriol* **183**: 5187-5197.
 17. Kendall MM, Rasko DA, Sperandio V (2007) Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**: 4875-4884.
 18. Jeon B, Itoh K (2007) Production of shiga toxin by a *luxS* mutant of *Escherichia coli* O157:H7 in vivo and in vitro. *Microbiol Immunol* **51**: 391-396.
 19. Dowd SE (2007) *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiol Lett* **273**: 214-223.
 20. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* **75**: 4597-4607.
 21. Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10420-10425.
 22. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8951-8956.
 23. Lee J, Jayaraman A, Wood TK (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* **7**: 42.
 24. Lan A, Bruneau A, Philippe C, Rochet V, Rouault A, Herve C, Roland N, Rabot S, Jan G (2007) Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *Br J Nutr* **97**: 714-724.
 25. Naylor SW, Gally DL, Low JC (2005) Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**: 419-441.

26. Mundy R, Girard F, FitzGerald AJ, Frankel G (2006) Comparison of colonization dynamics and pathology of mice infected with enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* and *Citrobacter rodentium*. *FEMS Microbiol Lett* **265**: 126-132.
27. Lievin-Le Moal V, Servin AL (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* **19**: 315-337.
28. Zoetendal EG , Vaughan EE, de Vos WM (2006) A microbial world within us. *Mol Microbiol* **59**: 1639-1650.
29. Medellin-Pena MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW (2007) Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4259-4267.
30. Hold, Georgina L., Pryde, Susan E., Russell, Valerie J., Furrrie, Elizabeth, and Flint, Harry J. (2002) Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 33-39.
31. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.
32. Salyers AA, Vercellotti JR, West SE, Wilkins TD (1977) Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol* **33**: 319-322.
33. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* **5**: 104-112.
34. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI (2001) Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* **291**: 881-884.
35. Walters M, Sircili MP, Sperandio V (2006) AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5668-5681.
36. Russell RM, Sharp FC, Rasko DA, Sperandio V (2007) QseA and GrlR/GrlA Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Genes in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5387-5392.
37. Sharp FC, Sperandio V (2007) QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**: 2432-2440.

38. Vareille M, de Sablet T, Hindre T, Martin C, Gobert AP (2007) Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10199-10204.
39. Walters M, Sperandio V (2006) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* **296**: 125-131.
40. Lyte M, Arulanandam BP, Frank CD (1996) Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. *J Lab Clin Med* **128**: 392-398.
41. Voigt W, Fruth A, Tschape H, Reissbrodt R, Williams PH (2006) Enterobacterial autoinducer of growth enhances shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **44**: 2247-2249.
42. Gamage SD, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2003) Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infect Immun* **71**: 3107-3115.
43. Gamage SD, Patton AK, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2006) Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine. *Infect Immun* **74**: 1977-1983.
44. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD (2006) Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9667-9672.
45. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
46. Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15196-15201.
47. Hungate RE (1969) in *Methods in Microbiology*, Norris, J.R.//Gibbons, D.W.// (New York), pp. 117-132.
48. Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* . Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.

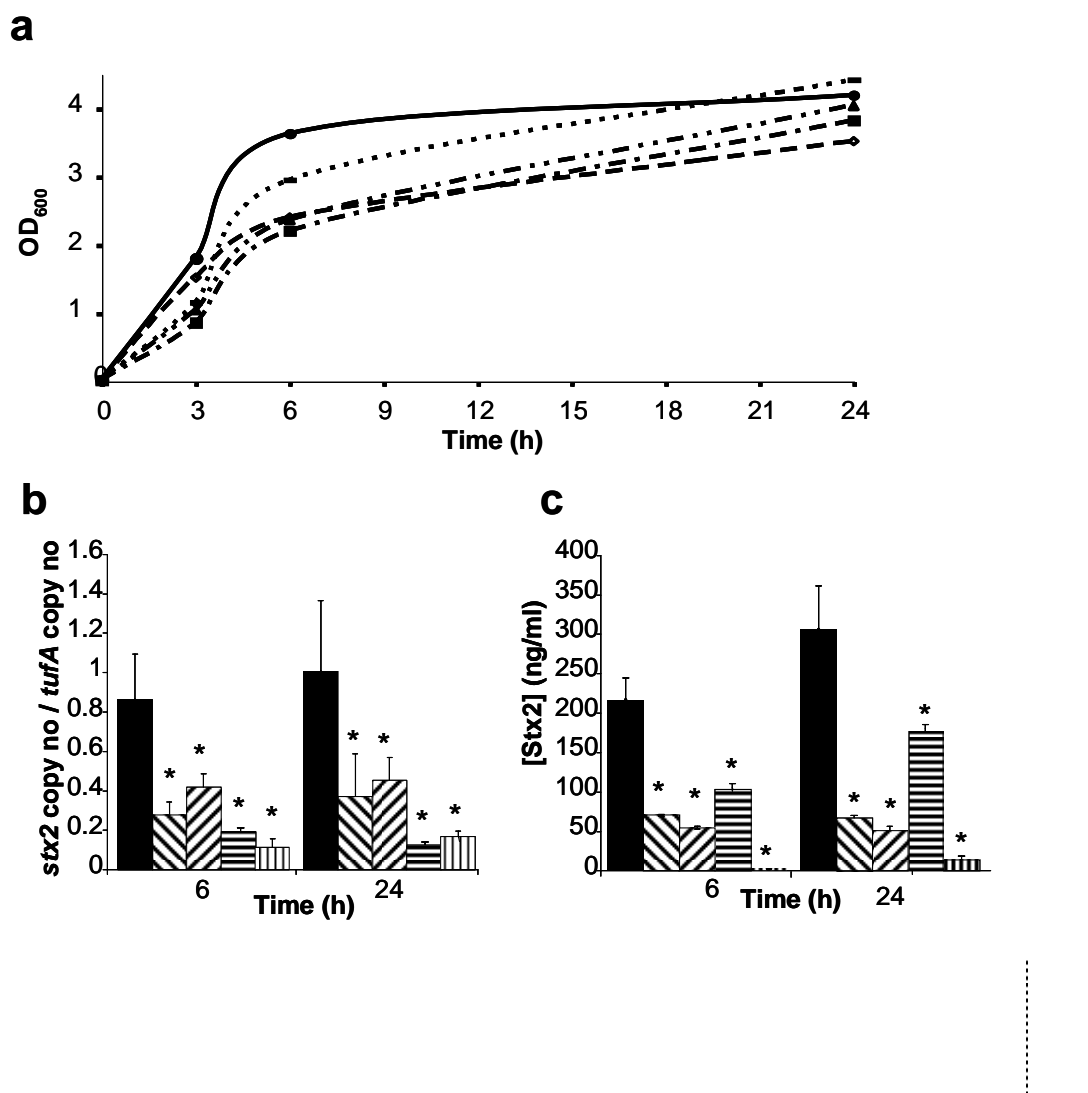


Fig. 1: Inhibition of Stx2 synthesis in media conditioned with human faecal microbiota. (a) Growth curves of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 in non-conditioned medium (black line) and in media conditioned with the faecal microbiota of four independent individuals (hatched lines). For each medium, a representative growth curve of three independent experiments is shown. At the indicated times, *stx2* mRNA levels in EDL933 (b) and Stx2 concentration in culture supernatants (c) were determined. Plain bars: unconditioned medium; stripped bars: medium conditioned with the different human microbiota. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.05$ for the unconditioned medium versus conditioned media.

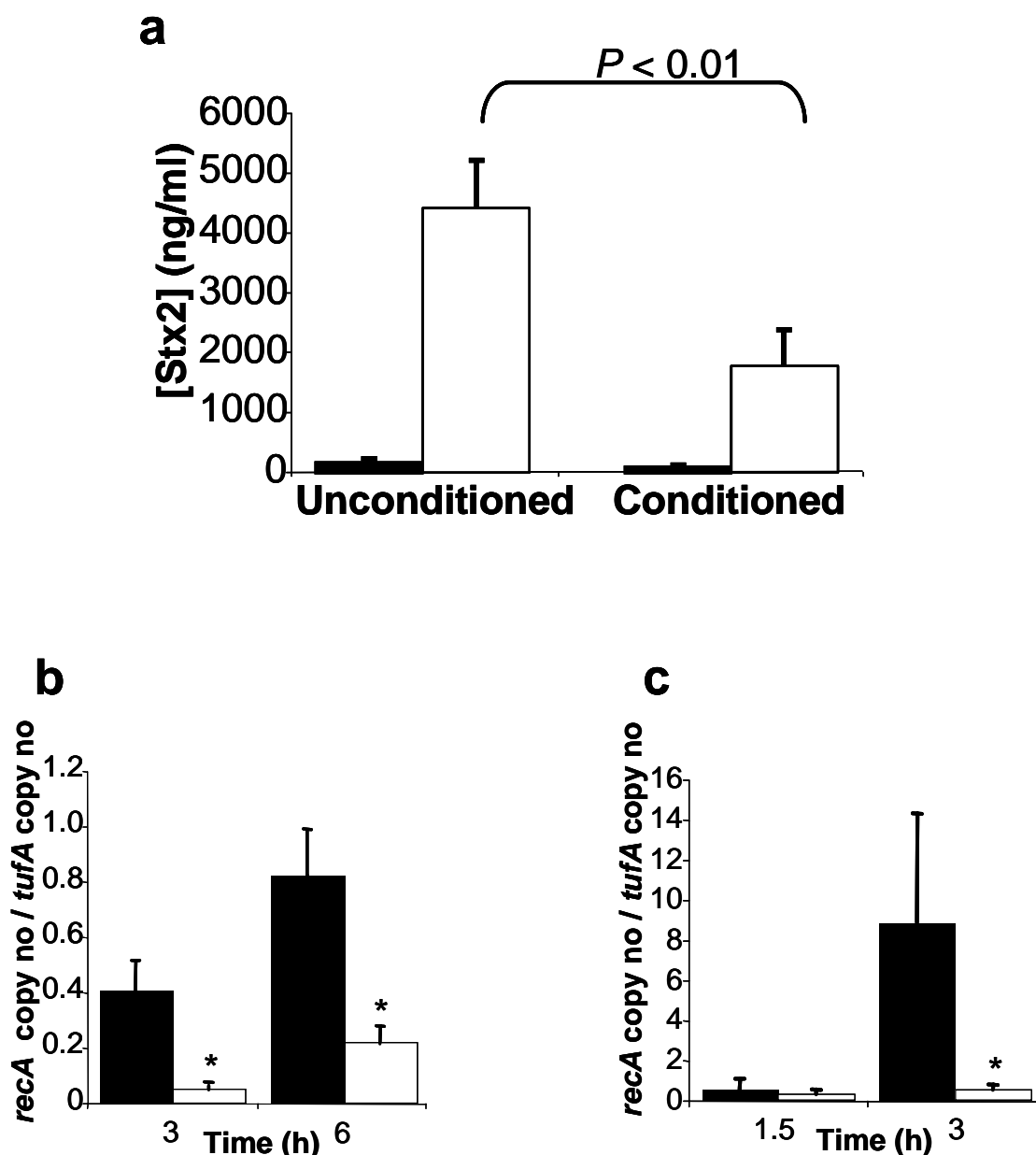


Fig. 2: Inhibition of ciprofloxacin-induced Stx2 synthesis and of *recA* expression in medium conditioned with human faecal microbiota. (a), Stx2 concentration in culture supernatants at 24 h. Plain bars: without ciprofloxacin treatment; open bars: under ciprofloxacin (25 ng ml⁻¹) exposure. *, $P < 0.01$ for the unconditioned versus the conditioned medium in the presence of ciprofloxacin. (b), *recA* mRNA levels in the absence of ciprofloxacin. (c), *recA* mRNA levels under ciprofloxacin (25 ng ml⁻¹) exposure. Plain bars: unconditioned medium; open bars: conditioned medium. *, $P < 0.05$ for the unconditioned versus the conditioned medium.

Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate.

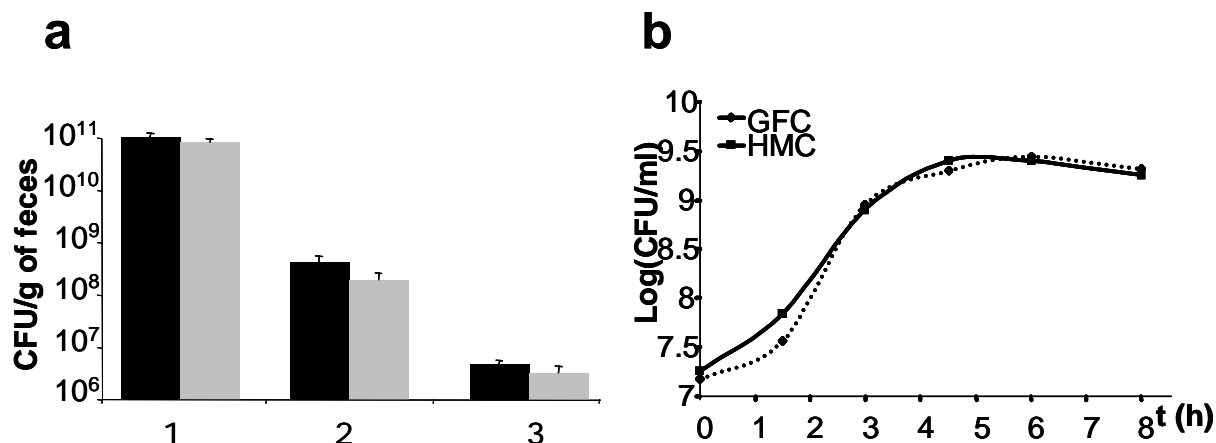


Fig. 3: Colonization of rats with human faecal microbiota and EDL933 growth in the caecal contents. a) numeration of the main bacterial groups 7 days after inoculation of rats with adult (plain bars) or child (grey bars) faecal flora. 1: anaerobes; 2: facultative anaerobes; 3: enterobacteriaceae. b) *In vitro* *E. coli* O157:H7 growth in the sterile caecal content of germ-free rats (GFC) and of rats inoculated with a human faecal microbiota (HMC). A representative growth curve of three independent experiments is shown. At 24 h, bacterial counts reached 9.1 Log (CFU/ml) for both cultures.

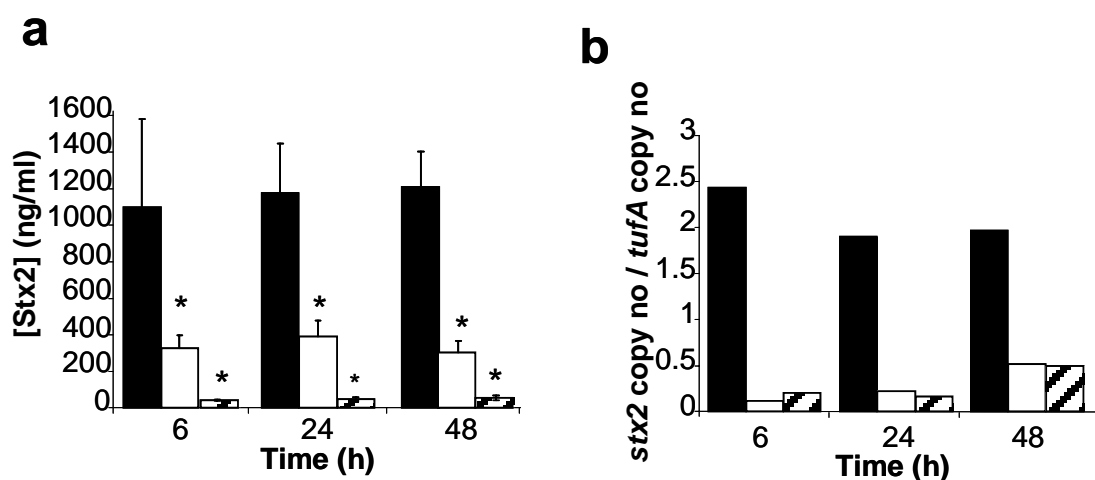


Fig. 4: Inhibition of Stx2 synthesis by factors produced by the human faecal microbiota in caecum contents of rats. *E. coli* EDL933 (4×10^6 bacteria/ml) was grown in the caecum content of germ-free rats (GFC, solid bars) or in the caecum content of human microbiota-associated rats (HMC) obtained with an adult (open bars) or a child (stripped bars) faecal microbiota. At the indicated times, Stx2 concentration in culture supernatants (a) and *stx2* mRNA levels in bacteria (b) were determined. In a) data represent the mean \pm SEM of three

independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.05$ for GFC versus HMC. In b) data represent the mean of two independent experiments performed in duplicate.

Phylum	Bacterial species	Origin	Stx2 production (% control)	
			6 h	24 h
Firmicutes	<i>Roseburia faecis</i>	CC 111*	278	154
	<i>Ruminococcus callidus</i>	ATCC 27760	186	52
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 20016	453	78
	<i>Clostridium leptum</i>	DSM 753	286	77
	<i>Clostridium coccooides</i>	DSM 935	115	63
Bacteroidetes	<i>Bacteroides sp.</i>	CC 134*	81	113
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	VIP 5482	78	31
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium breve</i>	IPC 6469T	173	321
Cocultures	<i>R. faecis</i> + <i>Bacteroides sp.</i>		459	109
	<i>B. breve</i> + <i>R. faecis</i>		159	57
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>Bacteroides sp.</i>		89	40
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>B. breve</i>		22	43
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>R. callidus</i>		34	24
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>R. faecis</i>		106	52
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>C. leptum</i>		93	21
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>C. coccooides</i>		85	56
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>L. reuteri</i>		69	85
	<i>B. thetaiotaomicron.</i> + <i>C. leptum</i> + <i>C. coccooides</i>		20	51
	<i>B. thetaiotaomicron</i> + <i>B. Breve</i> + <i>L. reuteri.</i>		23	130

Table 1: Stx2 production by EDL933 at 6 h and 24 h in Leedle and Hespell media conditioned by different bacterial species of the intestinal microbiota. *Strains were isolated in our laboratory from human stools.

**.PUBLICATION N° 3 : NITRIC OXIDE INHIBITS SHIGA-TOXIN
SYNTHESIS BY ENTEROHEMORRHAGIC *ESCHERICHIA COLI***

Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Marjolaine Vareille, Thibaut de Sablet, Thomas Hindré, Christine Martin, and Alain P. Gobert*

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Recherches de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Edited by Roy Curtiss, Arizona State University, Tempe, AZ, and approved May 3, 2007 (received for review March 20, 2007)

Shiga-toxin (Stx) is the cardinal virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The genes encoding Stx are carried by a lambdoid phage integrated in the bacterial genome and are fully expressed after a bacterial SOS response induced by DNA-damaging agents. Because nitric oxide (NO) is an essential mediator of the innate immune response of infected colonic mucosa, we aimed to determine its role in Stx production by EHEC. Here we demonstrate that chemical or cellular sources of NO inhibit spontaneous and mitomycin C-induced *stx* mRNA expression and Stx synthesis, without altering EHEC viability. The synthesis of *stx* phage is also reduced by NO. This inhibitory effect apparently occurs through the NO-mediated sensitization of EHEC because mutation of the NO sensor nitrite-sensitive repressor results in loss of NO inhibiting activity on *stx* expression. Thus our findings identify NO as an inhibitor of *stx* expressing-phage propagation and Stx release and thus as a potential protective factor limiting the development of hemolytic syndromes.

bacterial infection | mucosal immunology

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are pathogens carried by healthy rearing animals. After infection through the ingestion of contaminated food, EHEC colonize the large intestine and cause gastrointestinal diseases ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis. Life-threatening complications, such as hemolytic-uremic syndrome (HUS), develop in ≈ 5 –10% of EHEC-infected patients. HUS is defined by a triad of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure, which can yield to a chronic renal failure and even death (1–3). O157:H7 is the main EHEC serotype implicated in HUS in Europe and North America (3). The few recent large outbreaks (4, 5) underline that prevention of primary infection in human remains an elusive goal. Therefore, understanding host–EHEC interactions remains a critical issue in fighting bacterial infection and HUS development.

The main EHEC virulence factor associated with severe human diseases is the Shiga toxin (Stx). Both Stx1 and Stx2 are heteropolymers constituted by a catalytic A subunit and five B subunits implicated in the binding to the receptor glycolipid globotriaosylceramide-3 of endothelial cells. Internalized Stx alters ribosomal function and induces the death of vascular cells (1, 3). Stx1 and Stx2 are encoded by two type λ lysogenic phages integrated in the bacterial genome (6). In a lysogen, the expression of the phage operons is controlled by the protein CI. As a result of EHEC exposure to DNA-damaging agents such as mitomycin C (7) or H₂O₂ (8), RecA, which is part of the so-called SOS response, is activated by single-strand DNA and promotes the autocleavage of CI (9). Then, a regulatory cascade yields to the respective expression of the genes encoding the antiterminators N and Q, Stx, and proteins of phage morphogenesis and lysis (9–13). Bacteria are lysed and release Stx and free phage particles in the medium.

An important hallmark of EHEC pathogenesis is the intestinal colonization resulting in attaching and effacing lesions and in induction of a strong mucosal innate immune response. Clinical studies have thus highlighted the strong levels of circulating

chemokines and type 1 cytokines in HUS patients (14, 15). Other effectors of the nonspecific defense program can be produced by the inflamed mucosa, including nitric oxide (NO), a free radical that possesses numerous physiological properties notably in the immune system. Cellular production of NO requires the enzyme NO synthase that oxidizes L-arginine as a substrate; the calcium-independent inducible NO synthase (iNOS) isoform is expressed in numerous cells, e.g., enterocytes, in response to type 1 cytokines (16). High output of iNOS-derived NO is cytotoxic for pathogenic bacteria (17) or may induce transcriptomic changes (18–21) by interacting with different NO sensors such as the nitrite-sensitive repressor (NsrR), a key regulator of the nitrosative stress in enterobacteria (22, 23). NsrR DNA-binding activity is suppressed by NO, yielding to the expression of various genes involved in NO detoxification.

We now show that NO donors-derived NO signals in EHEC through NsrR to inhibit *stx2* mRNA expression, Stx2 synthesis, and *stx2*-phage release. Moreover, in the presence of NO, the expression of *recA* is down-regulated in mitomycin C-treated EHEC, providing a first line of evidence that NO suppresses the bacterial SOS response induced by DNA-damaging agents. In addition, we demonstrate that NO-producing cells inhibit *stx2* gene expression in EHEC/activated human epithelial cells cocultures. Switching the concept that NO is an inducer of the bacterial SOS response, we suggest that NO sensitizes and protects EHEC from DNA damages, thus inhibiting Stx synthesis.

Results

Effect of NO on EHEC Growth and Survival. To establish whether NO affects the growth of the strain EDL933, we treated bacterial suspensions with the NO donor NOR-4 (200 μ M), in the presence or absence of mitomycin C (200 ng/ml). NO was consistently generated in the bacteria culture medium during the first 12 h and then reached a plateau (Fig. 1*a*). The growth of the strain EDL933 was not affected by NO during the early and late growth phases (Fig. 1*b*). A dramatic decrease of EHEC growth was observed when bacteria were treated with mitomycin C; this loss of survival was completely inhibited when using NOR-4 (Fig. 1*b*).

NO-Dependent Stx Synthesis Inhibition. We next investigated the effect of NO on *stx2* gene expression and Stx2 production by EHEC. In the culture of EDL933, *stx2* mRNA was poorly expressed at 6 and 12 h of culture but was markedly induced at

Author contributions: A.P.G. designed research; M.V. performed research; T.d.S. and C.M. contributed new reagents/analytic tools; M.V., T.H., C.M., and A.P.G. analyzed data; and A.P.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; HUS, hemolytic-uremic syndrome; Stx, Shiga toxin; iNOS, inducible NO synthase; NsrR, nitrite-sensitive repressor; NIL, L-N^G-(1-*iminoethyl*)lysine.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: agobert@clermont.inra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0702589104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

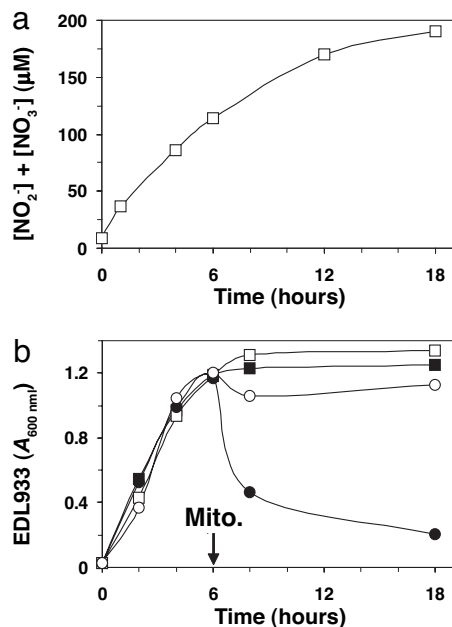


Fig. 1. Kinetics of NO release by NOR-4 and EHEC growth. (a) NO_2^- and NO_3^- concentrations determined in LB medium containing $200 \mu\text{M}$ NOR-4. (b) The strain EDL933 was cultured in LB medium with NOR-4 and/or mitomycin C (Mito.). NOR-4 was added at the beginning of the culture, and mitomycin C was added after 6 h. $A_{600 \text{ nm}}$ was determined at indicated times. This figure is the representative data of three independent experiments. ■, EDL933; □, + NOR-4; ●, + mitomycin C; ○, + NOR-4 + mitomycin C.

18 h and after (Fig. 2a); this increase was completely inhibited when $200 \mu\text{M}$ NOR-4 were added to the EDL933 cultures (Fig. 2a). Similarly, Stx2 synthesis was inhibited by ≈ 4.5 -fold at 18 and 24 h when NOR-4 was used (Fig. 2b). The use of the NO scavengers cPTIO in NOR-4-treated EHEC cultures restored *stx2* gene expression (Fig. 2a) and Stx2 generation (Fig. 2b).

To further assess the ability of NO to prevent Stx2 synthesis by EHEC, we stimulated bacteria with mitomycin C in the presence or absence of NOR-4. Addition of mitomycin C to the EDL933 cultures resulted in up-regulation of the *stx2* gene (Fig. 3a) and in a large production of Stx2 (Fig. 3b). When mitomycin C-treated bacteria were cultured in the presence of $200 \mu\text{M}$ NOR-4, *stx2* mRNA expression (Fig. 3a) and Stx2 generation (Fig. 3b) were significantly inhibited by 6.4 ± 1.7 - and 2.5 ± 0.9 -fold in comparison with EHEC stimulated with mitomycin C, respectively. The expression of the gene *stx2* (Fig. 3a) and Stx2 synthesis (Fig. 3b) were partially restored by using cPTIO in the NOR-4-treated EDL933 cultures.

We also found that *stx1* was poorly expressed, was not up-regulated under mitomycin C treatment, and was not modulated by NOR-4 (data not shown). However, comparable results were obtained with the EHEC strain 86–24, which expresses only the gene *stx2* (data not shown).

Experiments performed with NOR-3 gave similar results than those obtained with NOR-4 [supporting information (SI) Fig. 7]; however, *stx2* mRNA expression and Stx2 synthesis by EDL933 were not inhibited by $200 \mu\text{M}$ DEA-NONOate (SI Fig. 7), a NO donor that rapidly releases NO ($[\text{NO}_2^-] + [\text{NO}_3^-] \approx 200 \mu\text{M}$, 10 min after the addition of DEA-NONOate). In addition, when NOR-4 was preincubated for 24 h in water before use on bacteria, NO was not further released during the experiments and the inhibitory effect on Stx2 synthesis was not observed (data not shown). Importantly, when NOR-4 and mitomycin C were added together to the bacteria, we did not observe the inhibition of *stx2* mRNA expression and of Stx2 synthesis (data not shown);

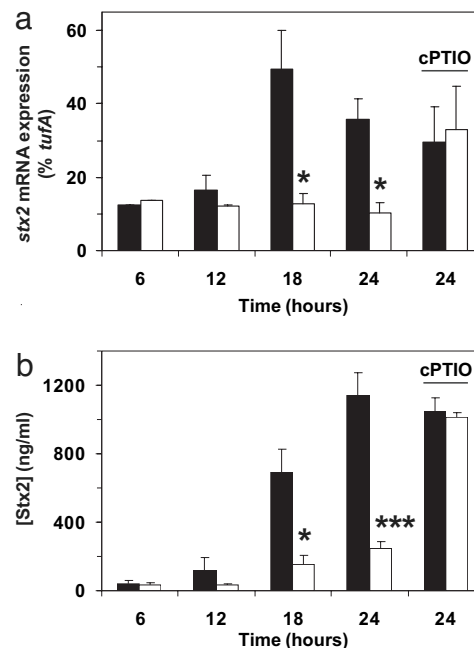


Fig. 2. NOR-4 inhibits *stx2* mRNA expression and Stx2 production by EDL933. The strain EDL933 ($\approx 10^6$ bacteria/ml) was grown in the presence (open bars) or absence (solid bars) of NOR-4, with or without cPTIO. At the indicated times, *stx2* mRNA levels in bacteria and Stx2 concentration in culture supernatants were determined by real-time RT-PCR and ELISA, respectively. Data represent the mean \pm SEM of three to seven experiments. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ for EDL933 + NOR-4 vs. EDL933.

the maximal NO inhibitory effect was observed when mitomycin C was added 6 h after NOR-4.

Finally, to determine whether NO specifically inhibited *stx2* mRNA expression we analyzed the expression of the gene *fliC* encoding the flagellin H7. The expression level of the gene *fliC* and flagellin synthesis were not modified when the bacteria were treated by NOR-4 (SI Fig. 8).

NO-Dependent Decrease of *stx2*-Phage Release. The gene *stx2* of the strain EDL933 is encoded by the phage BP-933W integrated in the bacterial genome. Because NOR-4 inhibits *stx2* mRNA expression, we reasoned that NOR-4 may suppress phage production and release by EHEC. The total phage particles were concentrated from culture supernatants of the strain EDL933 exposed or not to mitomycin C and/or NOR-4. After concentration, the presence of phages was visualized by electronic microscopy in each sample (SI Fig. 9). We then analyzed by PCR (Fig. 3c) and real-time PCR (Fig. 3d) the presence of the gene *stx2* in the viral genome of each sample. The phages harboring the gene *stx2* were more present in the supernatant of mitomycin C-treated EHEC when compared with the supernatant of bacteria alone; moreover, this induction under mitomycin C treatment was inhibited by $79.2 \pm 5.2\%$ when NOR-4 was added to the bacteria (Fig. 3d).

NO Down-Regulates *recA* mRNA Expression. RecA activation is a reliable marker of the SOS response that induces the self cleavage of the phage repressors CI (9) and of the *recA* gene repressor LexA (24, 25). To gain further insight in the mechanism by which NO inhibits *stx2* mRNA expression, we therefore analyzed the effect of NOR-4 on *recA* mRNA expression. The expression of the gene was up-regulated by ≈ 9 -fold in mitomycin C-treated EHEC in comparison with untreated bacteria; this

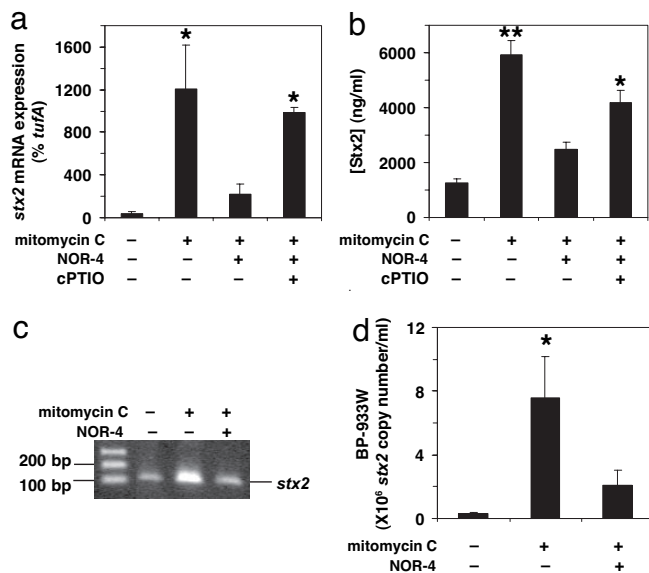


Fig. 3. Effect of NOR-4 in the mitomycin C-induced Stx2 synthesis. (a and b) The strain EDL933 was treated or not with NOR-4 or cPTIO; mitomycin C was added to the cultures 6 h afterward. The levels of *stx2* mRNA (a) and Stx2 concentrations (b) were analyzed 2 and 12 h after the mitomycin C treatment, respectively. (c and d) Phage particles were concentrated from the bacteria supernatants harvested 12 h after mitomycin C treatment. The expression of the gene *stx2* was analyzed by PCR (c) and real-time PCR (d) from 5 and 1 μ l of the phage suspension, respectively. Data represent the mean \pm SEM of five (a and b) and three (d) independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. untreated bacteria and bacteria treated with NOR-4.

increase was significantly inhibited by 60% in the presence of NOR-4 (Fig. 4).

Additionally, without mitomycin C treatment, *recA* mRNA expression was decreased by $60.8 \pm 1.8\%$ when EDL933 were treated for 18 h with NOR-4 ($P < 0.01$; $n = 4$ experiments).

NsrR Is Implicated in NO-Dependent Regulation of *stx2* Expression. Bacteria detect and respond to NO by a major NO sensor, NsrR. To investigate the implication of this transcriptional repressor in the NO-dependent down-regulation of *stx2* gene expression, we constructed the *nsrR* isogenic mutant in the strain EDL933 and the isogenic mutant transcomplemented with the plasmid pTrc99A harboring the entire *nsrR* gene [EDL933 Δ *nsrR*(pTrc99A-*nsrR*)]. In the presence or absence of NOR-4, the growth of the three strains was identical (data not shown).

The expression of the gene *stx2* (Fig. 5a) and the production of Stx2 (Fig. 5b) were not significantly modulated in the Δ *nsrR* and in the Δ *nsrR*(pTrc99A-*nsrR*) strains in comparison with EDL933 under basal conditions. However, even though to be not statistically significant, *stx2* mRNA levels in the strain Δ *nsrR* treated with mitomycin C were decreased in comparison with those from EDL933 or Δ *nsrR*(pTrc99A-*nsrR*) strains stimulated with mitomycin C (Fig. 5a). Similarly, under mitomycin C treatment, Stx2 was significantly less produced by the mutant strain when compared with both other strains. Moreover, the inhibitory effect of NO on *stx2* mRNA expression (Fig. 5a) and Stx2 production (Fig. 5b) by EDL933 was not observed in the strain EDL933 Δ *nsrR*. Similar responses to mitomycin C and/or NOR-4 were observed between the transcomplemented Δ *nsrR* and parental strains (Fig. 5a and b).

Concomitantly to *stx2* mRNA expression, *recA* mRNA expression was increased by ≈ 7 - and 2-fold for the strain EDL933 and EDL933 Δ *nsrR* treated with mitomycin C in comparison with untreated cultures, respectively (data not shown).

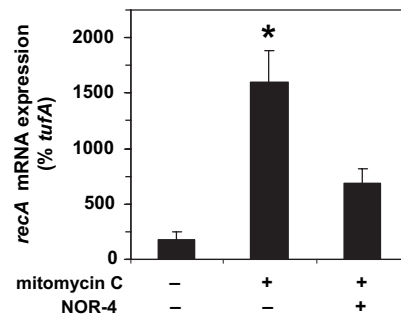


Fig. 4. Analysis of *recA* gene expression. Cultures of EDL933 were treated or not with NOR-4. Mitomycin C was added 6 h afterward. *recA* mRNA levels were analyzed by real-time PCR after 2 h. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. both other conditions.

Inhibition of *stx2* Gene Expression by Human Epithelial Cell-Derived NO. We next investigated the effect of NO produced by activated cells on *stx2* expression. We used the human colonic epithelial cell line Hct-8. These cells were first treated with a cytokine mix well known to induce iNOS expression and NO production (16). Then, cells were infected with EDL933 for 18 h in the presence or absence of an iNOS inhibitor, L-N^G-(1-iminoethyl)lysine (NIL). When bacteria were cocultured with cytokines-activated Hct-8 cells, the spontaneous *stx2* gene expression was significantly inhibited when compared with cocultures with unactivated Hct-8 cells; this decrease was reversed by using NIL in the culture of activated cells (Fig. 6a). Concomitantly, NO was generated by activated cells but not by control cells or activated cells treated with NIL (Fig. 6a).

In another set of experiments, EHEC were added to control or activated Hct-8 cells for 6 h; then mitomycin C was added and bacteria were harvested 3 h after to analyze the expression of the gene *stx2* (Fig. 6b). The *stx2* mRNA levels were significantly increased by 7-fold in the presence of mitomycin C in the cocultures EHEC/Hct-8 cells. This increase was significantly inhibited by $\approx 55\%$ when bacteria were cocultured with NO producing epithelial cells. We also found that the use of NIL in EHEC/activated Hct-8 cells cocultures completely inhibited NO synthesis and restored *stx2* mRNA expression (Fig. 6b).

We confirmed our results by measurement of the cytotoxicity of the strain EDL933 in the different conditions. Without mitomycin C, the strain EDL933 induced a $\approx 15\%$ cell mortality (SI Fig. 10), that was completely inhibited when Hct-8 cells were pretreated with cytokines. In the presence of mitomycin C, the cytotoxicity of the strain EDL933 on control cells and activated cells was $\approx 39\%$ and 0%, respectively (SI Fig. 10). Survival was not modified when cells were treated with cytokines or mitomycin C without bacteria. Together, these results establish that in the presence of NO producing enterocytes, i.e., activated cells, Stx production is inhibited and the cytotoxicity is decreased.

Discussion

To limit the production of Stx during EHEC infection represents the ultimate strategy to avoid the development of hemolytic syndromes. In this contribution different approaches have aimed to neutralize Stx by the use of pharmacological compounds (26), specific antibodies (27, 28), or recombinant bacteria expressing globotriaosylceramide-3 (29). Herein, we present NO, a critical mediator of the host mucosal innate immune response, as a potent inhibitor of Stx2 synthesis by EHEC. Our finding has a direct biological relevance, because we show that not only chemical sources of NO, but also activated human epithelial cells-derived NO, inhibits *stx2* gene expression and consequently Stx2 release.

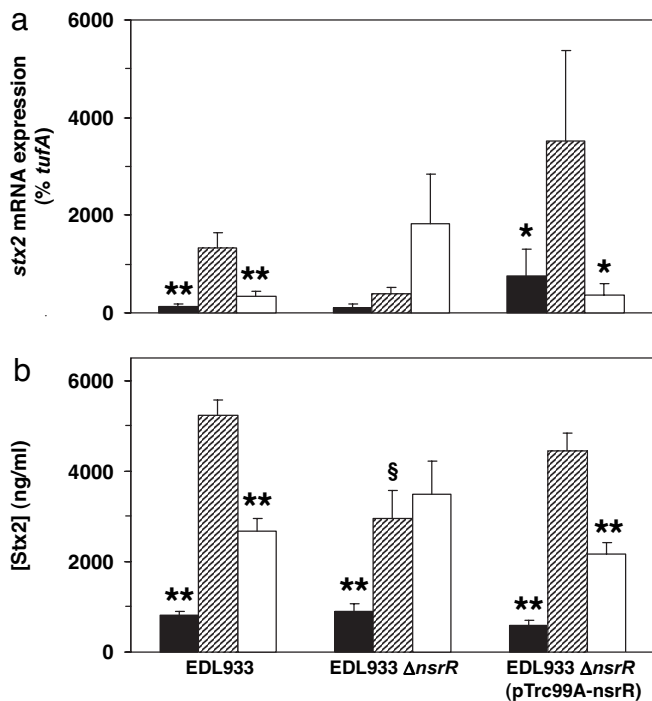


Fig. 5. Modulation of *stx2* gene expression in the $\Delta nsrR$ strain. The strains EDL933, $\Delta nsrR$, and $\Delta nsrR(pTrc99A-nsrR)$ were cultured alone (plain bars) or treated with mitomycin C (hatched bars) or NOR-4 plus mitomycin C (open bars). *stx2* mRNA expression (a) and Stx2 concentration (b) were analyzed 2 and 12 h after the mitomycin C addition, respectively. Values are the mean \pm SEM of five independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared with bacteria treated with mitomycin C; §, $P < 0.05$ vs. EDL933 and EDL933 $\Delta nsrR(pTrc99A-nsrR)$ in the presence of mitomycin C.

We established that the spontaneous and the mitomycin C-induced activation of RecA and release of Stx2 were inhibited by NO. Previous studies identified RecA as an important contributor to spontaneous induction of phage release and Stx production (30). Thus, we propose that NO inhibited *stx2* mRNA expression in both conditions by a similar mechanism, i.e., the inhibition of RecA activation. Nevertheless, the idea that NO is associated with decreased bacterial SOS response and *stx* gene expression is somewhat unexpected, given that reactive nitrogen species may induce DNA damage. Thus, when used at a high concentration (35 nmol/ml/min vs. ≈ 0.5 nmol/ml/min in our experiments), NO may act as an inducer of the SOS response in *E. coli* (31); in these conditions, the *recA* deletion leads to a high sensitivity to NO (31), demonstrating that the SOS response is induced and essential to fight the deleterious effects of NO. Nevertheless, “physiological” amounts of NO do not stimulate the SOS response in *Salmonella enterica* because RecA is not essential to prevent NO-dependent bacterial DNA fragmentation (32). Moreover, several transcriptomic analysis of *E. coli* demonstrated that expression of the genes of the SOS response was not enhanced following exposure to NO (18–21). Additionally, we observed that *stx2* mRNA expression was not modulated when bacteria were treated at the same time with mitomycin C and NOR-4. Although this result can be explained by the delay of several hours required to generate significant levels of NO, we suggest that the inhibition of the mitomycin C-induced SOS response and *stx2* gene expression is linked to a long time exposure of EHEC to NO. In support of this hypothesis, we also found that Stx2 production was inhibited in EHEC treated by NO donors with elevated half-life (NOR-3 and NOR-4), but not by DEA-NONOate that releases NO within few minutes.

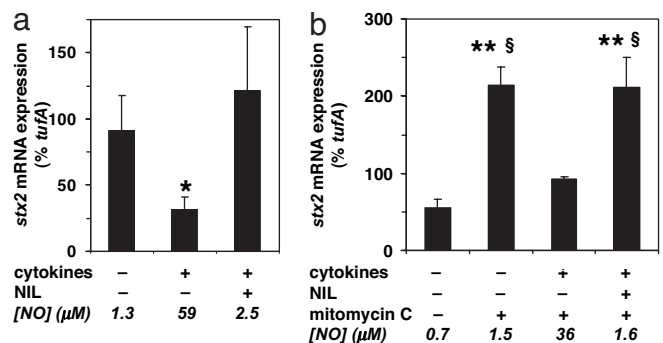


Fig. 6. Activated human epithelial cells inhibit *stx2* gene expression by a NO-dependent mechanism. Human epithelial cells were activated or not with a cytokine mix overnight. Medium was changed, and the strain EDL933 was added to the cells in the presence or absence of NIL. (a) The levels of *stx2* mRNA were determined by real-time RT-PCR after 18 h of coculture. Data represent the mean \pm SEM of three experiments. *, $P < 0.05$ vs. EDL933 cocultured with unactivated cells. (b) Mitomycin C was added 6 h after the beginning of the coculture. The levels of *stx2* mRNA were analyzed 2 h after the mitomycin C treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments. **, $P < 0.01$ compared with bacteria cocultured with control cells; §, $P < 0.05$ compared with EDL933 cocultured with activated cells in the presence of mitomycin C. [NO] represents the mean of four NO_3^-/NO_2^- concentration measurements performed in supernatants of cells cultured for 18 h (a) and 9 h (b) without bacteria.

Investigating the mechanism by which NO suppresses Stx synthesis, we focused on the effect of one of the main bacterial NO sensor, NsrR. Our results indicate that NO signals in EDL933 strain through this sensor to mediate the NO-dependent *stx2* mRNA expression inhibition. Interestingly, we observed that the *nsrR* mutation yields to a decrease of mitomycin C-induced *stx2* gene expression. This information led us to conclude that relieving NsrR DNA-binding activity, either by the effect of NO or by gene deletion, yields to the down-regulation of *stx2* gene expression, and supports the likelihood that NsrR represses genes implicated in BP-933W gene regulation. The identification of the different DNA-binding site of this repressor in the strain EDL933 is therefore underway in our laboratory. Nevertheless, we also envisage that NO may protect EHEC from mitomycin C-induced BP-933W gene expression by interacting with other NO sensor and/or global regulator or by directly modulating protein activity by S-nitrosylation.

The innate immune function of NO refers to its ability to modulate inflammatory process and to kill pathogens (17). In our experiments, EHEC killing was not induced by 200 μM NO, as described for *E. coli* or other Gram-negative pathogenic bacteria (31–34). Further, the mitomycin C-induced EHEC killing was reversed by NO, probably because phage synthesis was inhibited by NO, thus limiting bacterial killing. Similarly, it has been shown that the use of glutathione–NO in *E. coli* cultures suppresses the bactericidal effect of hydrogen peroxide and hypochlorous acid (35). Of importance, it has been described that *stx* genes can be horizontally transferred by the phage to commensal *E. coli* (36). Consequently, the phage-susceptible intestinal microbiota can produce Stx and may participate in the pathogenesis of hemolytic syndromes (36, 37). Thus, by inhibiting also the synthesis and the dissemination of the phage particles, NO may exert a collaterally protective effect by reducing the infection of intestinal flora by the *stx*-phage. Additionally, it has been described that Stx plays a function in intestinal colonization by increasing EHEC adherence to enterocytes (38); we thus suggest that NO-mediated Stx synthesis inhibition could result in less host colonization.

Our study has provided insight into the host fighting against EHEC pathogenicity and HUS development. We establish that the host innate immune response represses EHEC virulence, with this particular insight that NO does not directly kill the pathogen but decreases the production of a toxin. Thus, increasing NO production in infected patients, by using NO donor or L-arginine treatment (39), might represent an alternative strategy to limit the development of HUS. Moreover, we propose that differential NO production in infected patients could represent a marker of host susceptibility for EHEC infection.

Materials and Methods

NO Donors, NO Scavengers, and NO Detection. NO was generated by three NO donors, namely DEA-NONOate, NOR-3, and NOR-4 with half-life in PBS, pH 7.4, at 37°C of 2, 30, and 60 min, respectively (see *SI Methods* for chemical formula). The NO scavenger cPTIO (250 μ M) was also used. These compounds were purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). The concentrations of the stable oxidized products of NO, NO_3^- and NO_2^- , were determined by using the Nitrite/Nitrate Assay Kit (Sigma, St. Louis, MO).

EHEC Strains and Culture Conditions. The EHEC strains EDL933 (40) and 86–24 (41) belonging to the serotype O157:H7 were used. Isolated colony of parental strains or isogenic mutants were grown overnight in LB broth containing kanamycin (50 μ g/ml) and/or ampicillin (50 μ g/ml) and subcultured ($A_{600} = 0.02$) in LB medium or used to infect the cells. Cultures were performed in the presence or absence of NO donors, NO scavenger, isopropyl β -D-thiogalactoside (1 mM), and/or mitomycin C (200 ng/ml). When indicated, an aliquot of each culture was harvested and centrifuged 10 min at $10,000 \times g$; the 0.2 μ m-filtered supernatants were used for Stx concentration determination and phage purification, and the pellets were used for RNA extraction.

Mutagenesis. Deletion of the *nsrR* gene and insertion of the gene conferring resistance to kanamycin in the strain EDL933 was obtained by using the one-step PCR-based method of Datsenko and Wanner (42). The pKOBEG plasmid expressing the *Ared* recombinases was electroporated into EDL933 strain. Strain *E. coli* K12 CH158 was used as a template to amplify its chromosomal copy of a gene conferring resistance to kanamycin, flanked by *nsrR*-specific sequences. The 5' ends of the primers (MtnsrR; *SI Table 1*) contain extension sequences, which consisted of the 50 first or 50 last nucleotides of *nsrR*. Mutants were created by electroporating the host strains carrying pKOBEG with purified linear PCR products and then plating the organisms on selective agar. Allelic exchange was confirmed by PCR analysis and DNA sequencing. The resulting mutants have lost spontaneously the pKOBEG plasmid.

Primers consisting of the first or last nucleotides of the *nsrR* ORF and of the restriction sequence of the enzymes BamHI and EcoRI (CmnsrR; *SI Table 1*) were used to PCR amplify the *nsrR* gene from genomic DNA of EDL933. Purified PCR products were digested by the relevant enzymes and ligated into the expression vector pTrc99A, conferring resistance to ampicillin, under the control of the isopropyl β -D-thiogalactoside-inducible *trc* promoter. The resulting plasmid (pTrc99A-nsrR) was electroporated into the *nsrR* mutant.

To verify the mutation and the complementation of *nsrR*, we analyzed by semiquantitative RT-PCR the expression of the gene *hmp*, which is repressed by NsrR. The level of *hmp* mRNA was spontaneously increased by ≈ 50 -fold in the Δ *nsrR* strain and was not modified in the Δ *nsrR*(pTrc99A-nsrR) strain in comparison with the parental strain (data not shown).

Cell Cultures and Infections. The globotriaosylceramide-3-positive human colonic epithelial cell line Hct-8 was maintained in DMEM/10% FCS/1% sodium pyruvate/10 mM Hepes/100 units/ml penicillin/100 μ g/ml streptomycin at 37°C under 5% CO_2 . Cells (10^6 per well) were plated on six-well plates and cultured for 7–10 days until confluence (3×10^6 cells per well). Cells were stimulated for 24 h with a cytokine mix (each obtained from Pierce, Rockford, IL), consisting of human IFN- γ (50 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml), and IL-1 β (5 ng/ml). Subsequently cells were washed, and a fresh complete medium devoid of antibiotics was added to the cultures, in the presence or absence of the iNOS inhibitor NIL (1 mM) and/or bacteria at a multiplicity of infection of 1.

Bacterial mRNA Analysis. To obtain standard curves for *stx1*, *stx2*, *recA*, and *tufA* genes, we first amplified genomic DNA from EDL933 strain with the primers Sstx1, Sstx2, SrecA, or StufA (*SI Table 1*) and 0.25 units of AccuTaq DNA polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY). PCR products were purified with the Strataprep PCR Purification Kit (Stratagene, La Jolla, CA), and DNA amounts were quantified by measuring A_{260} . PCR products were 10-fold serially diluted from 5×10^8 to 50 molecules/ μ l and amplified in the LightCycler apparatus (Roche, Mannheim, Germany) by the kit LightCycler Fast-Start DNA Master SYBR Green I (Roche) containing 0.5 μ M Estx1, Estx2, ErecA, or EtufA primers used for real-time RT-PCR (*SI Table 1*). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 51°C (Estx1, Estx2, and EtufA) or 57°C (ErecA) for 30 s, and 72°C for 45 s.

Total bacterial RNA was isolated by using TRIzol, and concentration was determined by measuring the A_{260} . Subsequently, 2 μ g of RNA from each sample was reverse-transcribed by using random primers and 5 units/ μ l SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Serial dilutions of cDNA were amplified in the LightCycler apparatus in the same conditions as for the standard curves with the primers Estx1, Estx2, EflcC [melting temperature (T_m) = 51°C], ErecA, Ehmp (T_m = 59°C), and EtufA (*SI Table 1*). The levels of *stx1*, *stx2*, *recA*, and *tufA* mRNA (copy number per nanogram of cDNA) were quantified by noting the fluorescence crossing point of the samples on the corresponding standard curve, and the results are presented as the ratios between the copy number of *stx1*, *stx2*, or *recA* mRNA and the copy number of *tufA* mRNA. For the other genes, results were calculated by using the comparative cycle threshold method in which the amount of target mRNA is normalized to the internal control *tufA*; results are expressed as relative mRNA expression compared with the strain EDL933 cultured alone.

Isolation, Observation, and Quantification of Phage Particles. Phages were purified as described by Fuchs *et al.* with slight modifications (30). Bacteria culture supernatants (5 ml) were filtered by using 0.2- μ m filters and incubated with RNase (10 μ g/ml) and DNase (40 units/ml) for 30 min at 37°C. Phage particles were pelleted by ultracentrifugation overnight at $76,000 \times g$ at 4°C, resuspended in 100 μ l of PBS, and used for electronic microscopy and *stx2* gene analysis.

Phage suspensions (10 μ l) were placed onto collodion-coated 300 mesh copper grids, negatively stained with 1% phosphotungstic acid for 1 min, and dried. Visualization was performed in a Hitachi (Krefeld, Germany) H-7650 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Phage suspensions (1 μ l) were boiled for 5 min at 95°C, and *stx2* was quantified by real-time PCR by using *stx2* or *tufA* primers and the same condition as for mRNA quantification. Moreover, classical PCR was performed with 5 μ l of the phage suspension, 0.5 units of AccuTaq (Sigma). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 51°C for 30 s, and 68°C for 30 s. The total

cycle numbers were 30. A final elongation step of 7 min at 72°C was then used. Absence of bacterial DNA in phage lysates was confirmed by the absence of *tufA* DNA as assayed by PCR and real-time PCR (data not shown).

Analysis of Toxin Production. Stx1 and Stx2 concentrations were measured in bacteria supernatants by ELISA, as described (43).

Immunoblotting. See *SI Methods*.

Cytotoxicity Assay. See *SI Methods*.

1. Paton JC, Paton AW (1998) *Clin Microbiol Rev* 11:450–479.
2. Garg AX, Suri RS, Barrowman N, Rehman F, Matsell D, Rosas-Arellano MP, Salvadori M, Haynes RB, Clark WF (2003) *J Am Med Assoc* 290:1360–1370.
3. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) *Lancet* 365:1073–1086.
4. French Multi-Agency Outbreak Investigation Team (2005) *Euro Surveill* 10:E051103.1, www.eurosurveillance.org/ew/2005/051103.asp#1.
5. Maki DG (2006) *N Engl J Med* 355:1952–1955.
6. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD (1986) *Infect Immun* 53:135–140.
7. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR (2000) *Emerg Infect Dis* 6:458–465.
8. Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK (2001) *Infect Immun* 69:1934–1937.
9. Koudelka AP, Hufnagel LA, Koudelka GB (2004) *J Bacteriol* 186:7659–7669.
10. Neely MN, Friedman DI (1998) *Mol Microbiol* 28:1255–1267.
11. Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, Yutsudo CH, Kimura S, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, *et al.* (1999) *Genes Genet Syst* 74:227–239.
12. Plunkett G, III, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR (1999) *J Bacteriol* 181:1767–1778.
13. Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M, Kimura S, Yutsudo CH, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, *et al.* (2000) *Gene* 258:127–139.
14. Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N, Okada S (1998) *Cytokine* 10:544–548.
15. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM (1992) *Kidney Int* 42:951–956.
16. Marion R, Coeffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotte P, Dechelotte P (2003) *Clin Nutr* 22:523–528.
17. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL, Wilson KT (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13844–13849.
18. Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:745–750.
19. Flatley J, Barrett J, Pullan ST, Hughes MN, Green J, Poole RK (2005) *J Biol Chem* 280:10065–10072.
20. Justino MC, Vicente JB, Teixeira M, Saraiva LM (2005) *J Biol Chem* 280:2636–2643.
21. Pullan ST, Gidley MD, Jones RA, Barrett J, Stevanin TM, Read RC, Green J, Poole RK (2007) *J Bacteriol* 189:1845–1855.
22. Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ, Gelfand MS (2005) *PLoS Comput Biol* 1:e55.

Statistics. Student's *t* test was used to determine significant difference when only two treatment groups were being compared. ANOVA with the Student–Newman–Keuls test was used to analyze significant differences among multiple groups.

We thank Annie Garrivier for technical assistance for phage-particle purification and Brigitte Gaillard-Martinie for electronic microscopy. We thank Stephen Spiro for discussions and comments on the results. This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique (to M.V. and T.H.) and from Région Auvergne (to M.V.).

23. Bodenmiller DM, Spiro S (2006) *J Bacteriol* 188:874–881.
24. Little JW, Edmiston SH, Pacelli LZ, Mount DW (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3225–3229.
25. Little JW, Mount DW, Yanisch-Perron CR (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4199–4203.
26. Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, Igai K, Omata K, Yaffe MB, Natori Y (2006) *FASEB J* 20:2597–2599.
27. Sheoran AS, Chapman-Bonfiglio S, Harvey BR, Mukherjee J, Georgiou G, Donohue-Rolfe A, Tzipori S (2005) *Infect Immun* 73:4607–4613.
28. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7082–7087.
29. Paton AW, Morona R, Paton JC (2000) *Nat Med* 6:265–270.
30. Fuchs S, Muhldorfer I, Donohue-Rolfe A, Kerenyi M, Emody L, Alexiev R, Nenkov P, Hacker J (1999) *Microb Pathog* 27:13–23.
31. Spek EJ, Wright TL, Stitt MS, Taghizadeh NR, Tannenbaum SR, Marinus MG, Engelward BP (2001) *J Bacteriol* 183:131–138.
32. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8496–8501.
33. Brunelli L, Crow JP, Beckman JS (1995) *Arch Biochem Biophys* 316:327–334.
34. De Groote MA, Granger D, Xu Y, Campbell G, Prince R, Fang FC (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6399–6403.
35. Marcinkiewicz J (1997) *Immunopharmacology* 37:35–41.
36. Gamage SD, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2003) *Infect Immun* 71:3107–3115.
37. Gamage SD, Patton AK, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2006) *Infect Immun* 74:1977–1983.
38. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9667–9672.
39. Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, Drachenberg CB, Boucher JL, Hacker A, Casero RA, Jr, *et al.* (2004) *J Immunol* 173:2109–2117.
40. Perna NT, Plunkett G, III, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, *et al.* (2001) *Nature* 409:529–533.
41. Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB (1993) *J Clin Invest* 92:1418–1424.
42. Datsenko KA, Wanner BL (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
43. Gobert AP, Varelle M, Glasser AL, Hindre T, de Sablet T, Martin C (2007) *J Immunol*, in press.

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxico-infections alimentaires conduisant à des colites hémorragiques pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique. Le facteur majeur de pathogénicité est la production de Shiga-toxines (Stx), dont la toxine Stx2. Nous avons étudié la production de toxine Stx2 *in vitro* par des souches STEC provenant de diverses origines (bovine ou clinique), appartenant à divers sérotypages, et codant pour différents variants Stx2. Nous avons montré que les souches O157:H7 les plus pathogènes possèdent le variant *stx*₂ et produisent de fortes quantités de Stx2 en conditions basales comme en présence d'un inducteur du système SOS. Les souches non-O157 présentant ces caractéristiques pourraient représenter un risque pour la santé humaine. Nous avons ensuite étudié l'effet de molécules présentes dans le tube digestif sur la synthèse de Stx2 par *E. coli* O157:H7. Les auto-inducteurs AI-2 et AI-3 du quorum sensing, produits par le microbiote intestinal, n'influencent pas la synthèse de Stx2, non plus que l'hormone intestinale norépinéphrine. Cependant, la protéine régulatrice QseA impliquée dans une voie de signalisation par le quorum sensing serait un activateur transcriptionnel de *stx*₂. Enfin, nous avons étudié la production de Stx2 par la souche EHEC O157:H7 EDL 933 dans un milieu se rapprochant le plus possible de celui rencontré *in vivo* par les EHEC, en particulier grâce à un modèle de rats associés au microbiote intestinal humain. Nous avons ainsi montré que le microbiote humain inhibe la transcription de *stx*₂ par l'inhibition de la transcription de *recA* même lors de l'induction du système SOS, et que cette inhibition peut être en partie attribuée à l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Mots clés : EHEC, STEC, Stx2, sérotypage, variants *stx*₂, bactériophages lambda, expression de *stx*₂, réponse SOS, microbiote, quorum sensing.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* are food poisoning pathogens causing hemorrhagic colitis and hemolytic and uremic syndrome. Their main virulence factors are Shiga toxins (Stxs), especially Stx2. In this work we first studied a subset of strains from different origins belonging to different serotypes and expressing different *stx*₂ variants. We found that the most pathogenic strains O157:H7 express the *stx*₂ variant and produce high levels of Stx2 in basal as well as in induced conditions. Non-O157:H7 strains showing the same properties could be dangerous for human health. We also investigate the effect of molecules found in the gastrointestinal tract on Stx2 synthesis. Nor quorum sensing autoinducers AI-2 and AI-3 produced by the intestinal microbiota neither the intestinal neuroendocrine hormone norepinephrine influence Stx2 synthesis. However, the protein regulator QseA involved in quorum sensing signalling pathway could be a transcriptional activator of *stx*₂. Finally, we studied Stx2 production by the O157:H7 strain EDL 933 in culture medium mimicking the living conditions of EHEC in the gut by using a human flora associated rat model. We show that the human microbiota transcriptionally inhibits Stx2 synthesis through transcriptional inhibition of *recA*. This inhibition can be partially attributed to the intestinal species *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Keywords: EHEC, STEC, Stx2, serotype, *stx*₂ variants, bacteriophages lambda, *stx*₂ expression, SOS response, microbiota, quorum sensing.