



**HAL**  
open science

# Portage animal des *Escherichia coli* entérohémorragiques : colonisation et interaction avec le microbiote digestif animal

Audrey Segura

► **To cite this version:**

Audrey Segura. Portage animal des *Escherichia coli* entérohémorragiques : colonisation et interaction avec le microbiote digestif animal. Toxicologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC002 . tel-01967620

**HAL Id: tel-01967620**

**<https://theses.hal.science/tel-01967620v1>**

Submitted on 1 Jan 2019

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE**  
**DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**  
N° d'ordre : D.U. 2864

## Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

**Spécialité**

**Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie Santé et Innovation**

**Soutenue le 09 Mars 2018**

**AUDREY SEGURA**

---

Portage animal des *Escherichia coli* entérohémorragiques :

Colonisation et interaction avec le microbiote digestif animal

---

Président      Nicolas Barnich, PR, UMR M2iSH, Université Clermont-Auvergne

Rapporteurs    Catherine SCHOULER, DR, UMR ISP, INRA Centre Val de Loire  
Frédéric AUVRAY, IR, IRSD, École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Membres        Estelle Loukiadis, PhD, ISPV, UMR Écologie Microbienne, VetAgro Sup Lyon  
Thomas HINDRÉ, MCU, UMR TIMC-IMAG, Université Grenoble Alpes

Directrice     Evelyne FORANO, DR, UMR MEDiS, INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes

---

Unité Microbiologie Environnement Digestif et Santé, UMR454, UCA, INRA  
Clermont Ferrand/Theix

---

## **REMERCIEMENTS**

*A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que la thèse n'est pas un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes qui a participé au bon déroulement de ma thèse et qui m'a permis de progresser scientifiquement et personnellement tout au long de ces trois années. La thèse ne se limite pas à un travail scientifique, c'est aussi des rencontres et des échanges amicaux.*

*Cette thèse a débuté dans l'Unité de Microbiologie de l'INRA de Theix dirigée par Régine Talon que je remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. L'Unité est devenue UMR MEDiS sous la direction de Pierre Peyret et d'Annick Bernalier-Donadille. Je tiens à remercier Annick pour son accueil mais surtout pour ses encouragements et son aide dans la recherche de « l'après-thèse ».*

*Tous mes remerciements vont à ma directrice de thèse, Evelyne Forano, et co-encadrante, Yolande Bertin, pour leur encadrement et la confiance qu'elles m'ont témoignée dans la réalisation de ce travail. Merci de toujours m'avoir guidée, encouragée et soutenue tout au long de ces trois années. Merci à vous pour vos multiples conseils techniques et scientifiques. Je vous remercie également pour votre disponibilité, votre optimisme mais aussi pour les grandes qualités humaines dont vous faites preuve. Enfin, merci à toutes les deux de la liberté que vous m'avez accordée pour mener ce projet et de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions possibles. Je vous en serai toujours reconnaissante.*

*Merci à Catherine Schouler et Frédéric Auvray de l'intérêt qu'ils ont porté à ce sujet de thèse et d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Je remercie également les autres membres du Jury, Estelle Loukiadis, Nicolas Barnich et Thomas Hindre qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je remercie Stéphanie Blanquet-Diot et Delphine Sergentet pour avoir fait partie de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos nombreux conseils scientifiques qui m'ont permis d'avancer.*

*Je remercie nos collaborateurs extérieurs de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Hubert Brugère et Delphine Bibbal, pour leur investissement dans ce travail. Merci à Hubert Brugère pour sa participation à mes comités de thèse.*

*Je souhaite remercier Frédérique Chaucheyras-Durand, Pascale Mosoni et Grégory Jubelin pour leur expertise, leur aide et leurs précieux conseils scientifiques. Je remercie également Mickaël Desvaux pour ses conseils avisés sur les biofilms.*

*Un GRAND merci à Alexandra Durand de m'avoir aidée tout au long de ce travail de thèse. Je te remercie sincèrement de m'avoir transmis ton savoir technique, pour tes conseils, ton soutien moral mais aussi ta bonne humeur qui ont grandement contribué à faire avancer ce travail. Merci encore d'avoir réalisé les manips de « dernières minutes » de fin de thèse. Merci pour toutes ces petites blagues réalisées derrière mon dos qui nous ont permis de rigoler un peu entre les manips (vengeance en préparation...). Et je n'oublie pas Annie que je soupçonne d'y avoir activement participé et que je remercie pour sa sympathie.*

*Mes remerciements vont également à Marine Bertoni (alias « Berton ») et Pauline Auffret (ou « Paupiette ») sans qui ma thèse n'aurait probablement pas avancé comme elle l'a fait. Je vous remercie toutes les deux pour l'efficacité et l'énergie que vous avez mises au profit de ce travail. Merci pour votre soutien et pour m'avoir aidée à surmonter les difficultés techniques (les extractions d'ARN, on s'en souviendra !). Pauline, je te remercie pour la montagne de travail que tu as effectuée et de continuer à nous aider même à plus de 15000 km*

*de nous ! Grâce à toi, la bioinformatique n'est plus insurmontable. J'ai rencontré deux belles personnes que je n'oublierai pas (surtout pas les petites bêtises de Berton ☺).*

*Je remercie Yacine Lebbaoui qui m'a énormément aidée et pour qui les extractions d'ADN n'ont plus aucun secret (les gels d'agarose non plus !). Je remercie également Laura Quentin que j'ai eu plaisir à encadrer au cours de son stage et qui a contribué à faire avancer ce travail.*

*Katy, merci beaucoup pour ton aide précieuse mais aussi pour ta bonne humeur constante qui ont été indispensables au bon déroulement de ma thèse. J'ai beaucoup apprécié nos moments sportifs mais aussi nos moments détentes dans les vagues sans oublier les sages soirées passées à chanter ! Merci de m'avoir apporté du réconfort (=chocolat) dans les derniers mois difficiles de la rédaction de ce mémoire. Tes rires (mais aussi tes cris !) dans les couloirs de l'INRA vont beaucoup me manquer.*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe.*

*Merci à Gloglo pour sa gentillesse et à Laureen, Lysiane, Fohet et Eve pour leurs conseils, leur aide, les dépannages urgents de matériels, de kits et bien d'autres encore... Merci à mes anciennes « colocs » de bureau, Sophie et Giulia, pour leur accueil et leur sympathie. Je remercie également mes nouvelles « colocs », Marion et Raphaële. Merci pour vos encouragements et les moments partagés au cours de ces quelques mois passés ensemble. C'était un plaisir de vous rencontrer et je vous souhaite bon courage pour la suite de la thèse. Je n'oublie pas Tiago que je remercie pour sa gentillesse et son soutien. Merci également à Ilham pour son soutien et pour les discussions partagées durant les derniers mois de cette thèse. Je remercie « Jojo la bricole » (Julien) pour sa joie de vivre et son aide dans les manip urgentes. Je remercie très sincèrement Laurie et Chloé pour leur gentillesse, leur humour et leur soutien moral mais aussi pour toutes les discussions très enrichissantes. Mes remerciements vont également à Sylvie, Stéphanie et Alexandre pour les commandes toujours urgentes, les services administratifs rendus, la gestion des problèmes d'ordinateur et bien d'autres, mais aussi pour leur accueil, leur gentillesse et leur bonne humeur.*

*Merci à tous pour tous les bons moments passés ensemble au bureau, au labo, à la pause-café, à la cantine, mais aussi en dehors, moments qui font de cette thèse une étape de ma vie que je n'oublierai jamais.*

*Je n'oublie pas Bertrand, Irena, Karol, Priscila et Susana. Merci de m'avoir si bien accueillie et intégrée lors de mon arrivée à Clermont-Ferrand.*

*Je remercie mes amies Marie, Floriane et Jennifer qui ont toujours été présentes et qui m'ont soutenue jusqu'au bout. Merci à elles de m'avoir écouté et permis de relâcher la pression quand il le fallait.*

*Je remercie tout particulièrement mes parents et ma grand-mère pour leur soutien, leurs encouragements et pour tout ce qu'ils m'ont donné. Je les remercie d'avoir essayé de comprendre mon sujet de thèse, quoiqu'il en soit, sans eux, je n'en serai pas là.*

*Je terminerai ces quelques lignes en remerciant plus particulièrement Geoffrey pour sa présence et son soutien quotidien tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir rassurée et confortée dans les moments difficiles. Sans toi, rien n'aurait été pareil...*

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
INTRODUCTION .....	13
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
CHAPITRE I : LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRAGIQUES .....	19
<b>I.1. Généralités sur les <i>E. coli</i> entérohémorragiques.....</b>	<b>19</b>
I.1.1. Définition et classification des EHEC.....	19
I.1.2. Les facteurs de virulence des EHEC .....	21
I.1.2.1. Les Shiga-toxines .....	21
I.1.2.1.1. Les phages <i>stx</i> .....	22
I.1.2.1.2. Structure et mode d'action des Shiga-toxines .....	23
I.1.2.1.3. Les sous-types de Shiga-toxines.....	24
I.1.2.2. Le locus d'effacement des entérocytes.....	24
I.1.2.2.1. Structure du locus d'effacement des entérocytes .....	25
I.1.2.2.2. L'appareil de sécrétion de type III.....	25
I.1.2.2.3. L'intimine .....	26
I.1.2.3. Les autres facteurs d'adhésion des EHEC non codés par le LEE .....	27
I.1.3. Les autres facteurs de virulence potentiels des EHEC .....	28
I.1.3.1. Le plasmide de virulence des EHEC .....	29
I.1.3.2. Les îlots génomiques .....	30
<b>I.2. Physiopathologie des infections humaines à EHEC .....</b>	<b>31</b>
I.2.1. Résistance à l'acidité gastrique.....	31
I.2.2. Adhésion et colonisation intestinale .....	31
I.2.3. Les signes cliniques .....	32
I.2.4. Traitements des infections à EHEC .....	33
<b>I.3. Épidémiologie des infections à EHEC .....</b>	<b>34</b>
I.3.1. Surveillance des infections à EHEC .....	34
I.3.2. Les épidémies majeures d'infections à EHEC.....	35
I.3.2.1. Les principales épidémies.....	35
I.3.2.2. Les épidémies en France .....	36
I.3.3. Sources et modes de transmission .....	37
CHAPITRE II : ÉCOLOGIE ANIMALE ET ENVIRONNEMENTALE DES STEC.....	39
<b>II.1. Présence des STEC chez les animaux .....</b>	<b>39</b>
II.1.1. Les espèces réservoirs .....	39
II.1.1.1. Les bovins .....	39
II.1.1.2. Les autres ruminants .....	39
II.1.2. Les hôtes accidentels .....	40
II.1.2.1. Les porcs.....	40
II.1.2.2. Les oiseaux .....	41
II.1.2.3. Les animaux de compagnie .....	41
II.1.3. Les culs de sac épidémiologiques .....	41
<b>II.2. Prévalence des STEC dans les élevages bovins.....</b>	<b>42</b>
II.2.1. Données chiffrées du portage des STEC chez les bovins .....	42

II.2.1.1. Dans les fèces .....	42
II.2.1.2. Sur les cuirs et les carcasses .....	44
II.2.2. Les facteurs de variation du portage STEC par les bovins .....	45
II.2.2.1. L'âge des animaux .....	45
II.2.2.2. Les saisons .....	46
II.2.2.3. Les « super-excréteurs » .....	47
II.2.2.4. Influence du régime alimentaire .....	47
II.2.2.5. Les conditions de logement des bovins.....	48
II.2.2.6. Le stress.....	48
II.2.2.7. Le microbiote intestinal.....	49
<b>II.3. Écologie des STEC dans l'environnement.....</b>	<b>49</b>
II.3.1. Les sources de transmission aux bovins .....	49
II.3.1.1. Survie et persistance des STEC dans les matières fécales animales.....	50
II.3.1.2. Survie et persistance des STEC dans les effluents d'origine bovine .....	51
II.3.1.3. Survie et persistance des STEC sur et dans les sols .....	52
II.3.1.4. Survie et persistance des STEC dans les eaux et l'alimentation du bétail .....	52
II.3.2. Les végétaux .....	52
II.3.3. La résistance des EHEC dans l'environnement .....	53
II.3.3.1. Les différents types de stress .....	54
II.3.3.2. Les systèmes toxine/antitoxine .....	55
II.3.3.3. Capacité des EHEC à adhérer et à former des biofilms .....	56
<b>CHAPITRE III : ÉCOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES EHEC DANS LE TUBE DIGESTIF DU BOVIN.....</b>	<b>59</b>
<b>III.1. Colonisation du tube digestif bovin .....</b>	<b>59</b>
III.1.1. Le tractus gastro-intestinal des bovins .....	59
III.1.2. Localisation des STEC dans le tractus gastro-intestinal du bovin .....	60
III.1.3. Facteurs d'adhésion et de colonisation .....	61
III.1.4. Les signes cliniques .....	63
<b>III.2. Le métabolisme des EHEC O157:H7 dans l'intestin du bovin .....</b>	<b>63</b>
III.2.1. Les sources exogènes de nutriments.....	63
III.2.2. Les sources endogènes de nutriments .....	64
III.2.2.1. Les sources de carbone dans le tube digestif bovin .....	64
III.2.2.1.1. Le mucus intestinal .....	64
III.2.2.1.2. Les substrats de la néoglucogenèse.....	66
III.2.2.2. Les sources d'azote dans le tube digestif bovin .....	68
III.2.2.2.1. Les acides aminés.....	68
III.2.2.2.2. L'éthanolamine .....	68
III.2.2.3. Stockage des sources de nutriments.....	70
III.2.2.4. Compétition avec le microbiote endogène pour les sources de nutriments .....	70
III.2.3. La chaîne respiratoire .....	71
<b>III.3. Interactions des EHEC avec le microbiote intestinal .....</b>	<b>75</b>
III.3.1. Diversité du microbiote intestinal bovin.....	75
III.3.2. Corrélation entre la diversité du microbiote intestinal et la prévalence des O157:H7 chez les bovins .....	77
<b>III.4. Stratégies de contrôle du portage de STEC chez les bovins .....</b>	<b>80</b>
III.4.1. Les pratiques d'élevage .....	80
III.4.2. La ration alimentaire.....	81
III.4.3. Les additifs alimentaires pour les bovins : les probiotiques .....	81
III.4.3.1. Les probiotiques testés en vue de réduire le portage.....	81
III.4.3.2. Modes d'action des probiotiques.....	82

III.4.4. Les bactériophages .....	83
III.4.5. La vaccination .....	84
OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	85
RÉSULTATS .....	89
CHAPITRE I .....	91
ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA SOUCHE EHEC O157:H7 EDL933 INCUBÉE <i>IN VITRO</i> EN CONTENUS DIGESTIFS BOVINS .....	91
<b>I.1. Introduction .....</b>	<b>93</b>
<b>I.2. Transcriptomic analysis reveals specific metabolic pathways of the enterohemorrhagic <i>E. coli</i> O157:H7 strain EDL933 in bovine intestinal contents.....</b>	<b>97</b>
<b>I.3. Résultats complémentaires .....</b>	<b>127</b>
I.3.1. Expression de gènes codant des facteurs d'adhésion et de virulence .....	127
I.3.1.1 Dans les contenus de rumen .....	127
I.3.1.2. Dans les contenus d'intestin grêle .....	127
I.3.1.3. Dans les contenus de rectum .....	128
I.3.2. Expression de gènes impliqués dans la résistance au stress .....	131
<b>I.4. Conclusion .....</b>	<b>133</b>
CHAPITRE II CARACTERISATION GENOMIQUE ET PHENOTYPIQUE DE LA SOUCHE <i>E. COLI</i> O157:H7 MC2 PERSISTANTE DANS UN ELEVAGE BOVIN EN FRANCE .....	137
<b>II.1. Introduction .....</b>	<b>139</b>
<b>II.2. Draft genome sequence of Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France .....</b>	<b>141</b>
<b>II.3. Factors involved in the persistence of a Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content .....</b>	<b>143</b>
<b>II.4. Draft genome sequence and characterization of commensal <i>Escherichia coli</i> BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract.....</b>	<b>179</b>
<b>II.5. Conclusion.....</b>	<b>193</b>
CHAPITRE III DEVELOPPEMENT D'UN MODELE POUR COMPRENDRE ET MAITRISER LE PORTAGE DIGESTIF DES EHEC CHEZ LES BOVINS .....	195
<b>III.1. Introduction .....</b>	<b>197</b>
<b>III.2. Inoculations expérimentales des bovins par des souches d'<i>E. coli</i> O157:H7 .....</b>	<b>197</b>
III.2.1. Âge des animaux.....	198
III.2.2. Durée de l'excrétion .....	198
III.2.3. Dose inoculée et répétition d'inoculation .....	199
III.2.4. Colonisation du tube digestif.....	200
III.3.1. Inoculation des animaux, dose de l'inoculum et suivi de l'excrétion fécale.....	201
III.3.2. Les prélèvements.....	203
III.3.3. Dénombrements de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> .....	204
III.3.3.1. Fèces, contenus digestifs et parois digestives .....	204
III.3.3.2. Les oreilles, les cuirs, les amygdales et les nœuds lymphatiques .....	204
III.3.4. Histologie .....	205
III.3.5. Test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	205
III.3.6. Analyse de la diversité du microbiote endogène.....	205

<b>III.4. Résultats</b> .....	<b>206</b>
III.4.1. Suivi clinique des bovins et des paramètres sanguins et biochimiques .....	206
III.4.2.1. Chez les bovins du groupe A.....	207
III.4.2.2. Chez les bovins du groupe B.....	207
III.4.3. Détection de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> dans les différents prélèvements.....	208
III.4.3.1. Sur les cuirs et dans les oreilles.....	208
III.4.3.2. Au niveau des amygdales et des nœuds lymphatiques digestifs .....	208
III.4.4.1. Dans les contenus digestifs des bovins du groupe A.....	209
III.4.4.2. A la surface des parois digestives des bovins du groupe A .....	209
III.4.4.3. Dans les contenus digestifs des bovins du groupe B .....	210
III.4.4.4. A la surface des parois digestives des bovins du groupe B .....	211
III.4.5. Analyses histologiques.....	211
III.4.6. Réponse inflammatoire .....	212
III.4.7. Diversité des communautés bactériennes des contenus digestifs .....	213
III.4.7.1. Description générale .....	213
III.4.7.2. Diversité bactérienne des contenus digestifs le jour de l'euthanasie .....	213
III.4.7.3. Diversité bactérienne des contenus digestifs avant l'inoculation de la souche MC2 .....	216
III.4.7.4. Comparaison des contenus digestifs des groupes A et T .....	218
<b>III.5. Discussion et conclusion</b> .....	<b>219</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>223</b>
1. Diversité génétique des souches STEC et EHEC O157:H7, facteurs de virulence et de fitness.....	225
2. Métabolisme des EHEC dans le tube digestif du bovin.....	226
3. Interaction STEC/EHEC et microbiote commensal .....	229
4. Persistance des STEC dans l'environnement .....	230
5. Utilisation de nouveaux probiotiques pour réduire le portage des STEC chez les ruminants .....	230
<b>VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE</b> .....	<b>233</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>237</b>
<b>ANNEXE 1</b> .....	<b>239</b>
<b>ANNEXE 2</b> .....	<b>241</b>
<b>ANNEXE 3</b> .....	<b>255</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>277</b>



# LISTE DES FIGURES

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Diagramme de Venn illustrant le système de classification actuel des EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d' <i>E. coli</i> .....	20
Figure 2 : Induction de la production des Shiga-toxines Stx1 et Stx2 .....	22
Figure 3 : Structure (A) et mode d'action des Shiga-toxines (B) .....	23
Figure 4 : Organisation génétique du LEE d'une souche EHEC O157:H7 .....	25
Figure 5 : Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III .....	26
Figure 6 : Représentation circulaire du plasmide pO157 d'une souche EHEC O157:H7 .....	29
Figure 7 : Adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales et formation des lésions A/E.....	32
Figure 8 : Surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2015 .....	35
Figure 9 : Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal .....	38
Figure 10 : Estimation de la prévalence d' <i>E. coli</i> O157 dans les matières fécales bovines de différents types de bovins dans différents pays .....	43
Figure 11 : Représentation schématique de la formation de biofilms et des facteurs associés chez une souche STEC.....	57
Figure 12 : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal du bovin.....	59
Figure 13 : Coupe histologique de la jonction recto-anale (RAJ) bovine .....	60
Figure 14 : Utilisation des oligosaccharides composant le mucus intestinal par les bactéries.....	65
Figure 15 : Voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des substrats néoglucogéniques de la souche EHEC O157:H7 EDL933 incubée <i>in vitro</i> dans du contenu intestinal bovin .....	67
Figure 16 : Voie de dégradation de l'éthanolamine chez la souche EHEC O157:H7 EDL933 .....	69
Figure 17 : Modulation du métabolisme et de la virulence des EHEC en réponse au fucose.....	71
Figure 18 : Schéma représentant le gradient de concentration en oxygène de l'épithélium à la lumière intestinale.....	73
Figure 19 : La chaîne respiratoire chez <i>E. coli</i> O157:H7 selon différentes conditions environnementales .....	74
Figure 20 : Représentation de la diversité du microbiote intestinal tout le long du tube digestif de l'animal.....	75
Figure 21 : Cascade de signalisation dépendante de QseC et QseE.....	79
Figure 22 : Implication du régulateur SdiA dans la colonisation des EHEC chez le bovin .....	80

## RÉSULTATS CHAPITRE I

Figure 1 : Schéma expérimental de l'étude transcriptomique de la souche EDL933 .....	93
Figure 2 : Profils des ARN au Bioanalyser 2100 Agilent .....	94
Figure 3 : Score qualité PHRED des séquences de la souche EDL933 incubée en contenu de rectum. 94	
Figure 4 : Workflow suivi pour l'analyse bioinformatique et statistique des données RNA-Seq.....	95
Figure 5 : Niveaux d'expression relative par RT-qPCR des gènes codant les systèmes toxine/anti-toxine.....	131
Figure 6 : Schéma récapitulatif des réponses physiologiques des EHEC dans les différents compartiments digestifs.....	135

## RÉSULTATS CHAPITRE III

Figure 1 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des bovins adultes (A) et des veaux (B) 198	
Figure 2 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des jeunes bovins.....	199
Figure 3 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des veaux âgés de 5 semaines inoculés avec $10^{10}$ bactéries.....	200
Figure 4 : Photos de l'hébergement des bovins en animalerie A3 (A, B) et en animalerie conventionnelle (C, D).....	202
Figure 5 : Phases expérimentales de l'étude.....	203
Figure 6 : Workflow suivi pour les analyses des données du séquençage de l'ADNr 16S bactérien ..	206
Figure 7 : Concentrations de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> excrétée dans les matières fécales des bovins du groupe A.....	207
Figure 8 : Concentrations de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> excrétée dans les matières fécales des bovins du groupe B.....	208
Figure 9 : Concentrations de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> dans les contenus digestifs des bovins du groupe A.....	209
Figure 10 : Concentration de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> adhérentes aux parois digestives des animaux du groupe A.....	210
Figure 11 : Concentrations de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> dans les contenus digestifs des bovins du groupe B.....	210
Figure 12 : Concentrations de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> adhérente aux parois digestives des animaux du groupe B.....	211
Figure 13 : Analyse histologique de la paroi iléale du bovin N°24 du groupe T (A, B) et du bovin N°45 du groupe A (C, D).....	212

Figure 14 : Analyse histologique de la paroi rectale du bovin N°9 du groupe T (A, B) et du bovin N°44 du groupe A (C, D) .....	212
Figure 15 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des animaux du groupe A.....	214
Figure 16 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rumen prélevés le jour de l'euthanasie.....	215
Figure 17 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rumen prélevés le jour de l'euthanasie .....	216
Figure 18 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des contenus ruminiaux avant l'inoculation et le jour de l'euthanasie .....	217
Figure 19 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des contenus du rectum avant l'inoculation et le jour de l'euthanasie.....	218

## **ANNEXE 2**

Figure S1 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des animaux du groupe T .....	241
Figure S2 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus d'iléon prélevés le jour de l'euthanasie .....	243
Figure S3 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus d'iléon prélevés le jour de l'euthanasie .....	244
Figure S4 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de caecum prélevés le jour de l'euthanasie.....	244
Figure S5 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de caecum prélevés le jour de l'euthanasie .....	245
Figure S6 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de côlon spiralé prélevés le jour de l'euthanasie.....	245
Figure S7 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de côlon spiralé prélevés le jour de l'euthanasie.....	246
Figure S8 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de côlon descendant prélevés le jour de l'euthanasie.....	246
Figure S9 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de côlon descendant prélevés le jour de l'euthanasie.....	247
Figure S10 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rectum prélevés le jour de l'euthanasie.....	247

Figure S11 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rectum prélevés le jour de l'euthanasie.....	248
Figure S12 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum et du genre des contenus digestifs prélevés le jour de l'euthanasie sur les animaux N°18 (groupe T) et N°36 (groupe A) .....	249
Figure S13 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rumen prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B) .....	250
Figure S14 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rumen prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B) .....	251
Figure S15 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rectum prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B) .....	252
Figure S16 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rectum prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B) .....	253

# LISTE DES TABLEAUX

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Les enzymes de la chaîne respiratoire chez <i>E. coli</i> .....	72
Tableau 2 : Densité bactérienne (bactérie/g) déterminée par PCR quantitative des contenus digestifs et muqueuses intestinales prélevés sur six bovins laitiers (Holstein) âgés de 5 ans .....	77

## RÉSULTATS CHAPITRE I

Tableau 1 : Gènes sur-exprimés par EDL933 en contenus de rumen impliqués dans l'adhésion en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log <sub>2</sub> FC > 2).....	127
Tableau 2 : Gènes sur-exprimés par EDL933 en contenus d'intestin grêle et de rectum impliqués dans l'adhésion et la virulence en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log <sub>2</sub> FC > 2) .....	129
Tableau 3 : Gènes sur-exprimés par EDL933 en contenus de rumen, d'intestin grêle et de rectum impliqués dans la résistance aux stress en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log <sub>2</sub> FC > 2) .....	132

## RÉSULTATS CHAPITRE III

Tableau 1 : Répartition et numéro des animaux des groupes A, B et T.....	201
Tableau 2 : Prélèvements effectués chez les trois groupes de bovins au moment de l'autopsie .....	204
Tableau 3 : Détection de la souche MC2 Rif <sup>R</sup> dans les amygdales des bovins des groupes A et B .....	208
Tableau 4 : Nombre de « reads », unités taxonomiques opérationnelles (OTU), diversité (Shannon index) et abondance (indice Chao) des communautés bactériennes des contenus digestifs et fèces des bovins des groupes A et T .....	213

## ANNEXE 1

Tableau S1 : Liste des couples d'amorces utilisés dans l'analyse complémentaire du RNA-Seq (Chapitre I).....	239
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## ANNEXE 2

Tableau S1 : Description de la composition des contenus digestifs et fèces des bovins des groupes A et T.....	241
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAEC : Attaching and effacing <i>E. coli</i>	Efa : EHEC factor for adherence
AAF : Aggregative adherent fimbriae	EFSA : European Food Safety Authority
Ac-CoA : Acétyl-CoA	EIEC : Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ADN : Acide désoxyribonucléique	ELF : <i>E. coli</i> laminin-binding-fimbriae
ADNc : ADN complémentaire	ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse
ADNr : ADN ribosomique	EPEC : Enteropathogenic <i>E. coli</i>
A/E : Attachement/effacement	EPS : Exopolysaccharide
AEEC : Attaching and Effacing <i>E. coli</i>	Esp : <i>E. coli</i> secreted protein
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments	ETEC : Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
AGV : Acide gras volatil	<i>eut</i> : ethanolamine utilization
AHL : N-acyl-homosérine lactone	ExPEC : Extraintestinal <i>E. coli</i>
AI : Auto-inducteur	EHEC : Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
AIEC : Adherent invasive <i>E. coli</i>	ESBL : Extended-spectrum $\beta$ -lactamase
ANSES : Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	FDA : Food and Drug Administration
ARN : Acide ribonucléique	FoodNet : Foodborne Diseases Active Surveillance Network
ARNm : ARN messenger	FWD : Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses
ARNr : ARN ribosomique	GABA : Acide $\gamma$ -aminobutyrique
AST3 : Appareil de sécrétion de type III	GalNAc : N-acétylgalactosamine
ATP : Adénosine triphosphate	Gb3 : Globotriacylcéramide
$a_w$ : Activité de l'eau	Gb4 : Globotétraacylcéramide
BaDiAl : Adaptation des Bactéries aux environnements Digestif et Alimentaire	GlcNAc : N-acétylglucosamine
Cah : Calcium binding antigen 43 homologue	HCP : Hemorrhagic <i>coli</i> pilus
CDC : Center for Disease Control and prevention	HPA : Hydroxypropionaldehyde
CDEC : Cell-detaching <i>E. coli</i>	Hsp : Heat shock protein
CFU : Colony Forming Unit	IFN : Interferon
Csp : Cold shock protein	IL : Interleukine
DAEC : Diffuse-adhering <i>E. coli</i>	INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
DMQ : Déméthyl-ménaquinones	InVS : Institut national de Veille Sanitaire
<i>E.</i> : <i>Escherichia</i>	Kb : Kilobase
EA : Éthanolamine	LEE : Locus d'effacement des entérocytes
<i>eae</i> : <i>E. coli</i> attaching and effacing	Ler : LEE-encoded regulator
EAEC : Enteroaggregative <i>E. coli</i>	LF : Lymphoid follicles
EAHEC : Enteroaggregative hemorrhagic <i>E. coli</i>	Lpf : Long polar fimbriae
EAL : Ethanolamine amonia-lyase	LPS : Lipopolysaccharide
ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control	MEDiS : Microbiologie Environnement Digestif et Santé
ECP : <i>E. coli</i> common pilus	MQ : Ménaquinone
	NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique  
Nle : Non LEE-encoded factor  
NMEC : Néonatal meningitidis *E. coli*  
NPP : Nombre le Plus Probable  
NTEC : Necrotoxigenic *E. coli*  
OI : O island  
OmpA : Outer membrane protein A  
OTU : Operational Taxonomic Unit  
Pb : paire de bases  
PC : Pseudo-crypte  
PCR : Polymerase chain reaction  
PE : Phosphatidyléthanolamine  
PGA : Polyglucosamine  
(p)ppGpp : Guanosine pentaphosphate  
PTT : Purpura thrombotique et  
thrombocytopénique  
Qse : Quorum sensing *E. coli*  
RAJ : Recto-anal junction  
RE : Réticulum endoplasmique  
RIN : RNA Integrity Number  
RNA-Seq : RNA sequencing  
RPKM : Reads Per Kilobase per Million  
Rpm : Rotation par minute  
RT-qPCR : Reverse transcription-quantitative  
Polymerase Chain Reaction

RTX : Repeats-in-toxin  
Saa : STEC autoagglutination adhesin  
Sab : STEC autotransporter contributing to  
biofilm formation  
Sep : Secretion of EHEC protein  
SHU : Syndrome hémolytique et urémique  
Spf : Sorbitol-fermenting fimbriae protein  
SSE : Stratified squamous epithelia  
STEC : Shiga-toxin producing *E. coli*  
Stx : Shiga-toxine  
TA : Toxine/anti-toxine  
TCA : Tricarboxylic acid  
TIAC : Toxi-infection alimentaire collective  
Tir : Translocated intimin receptor  
UE : Union Européenne  
UPEC : Uropathogenic *E. coli*  
UQ : Ubiquinone  
USDA : U.S. Department of Agriculture's Food  
Safety and Inspection Service  
UV : Ultra-violet  
Vero : « Verda Reno » ou cellules épithéliales  
rénales de singe africain  
VFDB : « Virulence Factors Database »



## INTRODUCTION



Cette thèse a débuté au sein de l'Unité de Microbiologie (U454) dans l'équipe BaDiAl : « Adaptation des Bactéries aux environnements Digestif et Alimentaire » à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand/Theix. Elle s'est poursuivie dans la nouvelle Unité Mixte de Recherche (UMR454) de Microbiologie Environnement Digestif et Santé (MEDiS, Université Clermont-Auvergne-INRA). Au sein de cette UMR, un axe de recherche est consacré à la maîtrise et à la prévention des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) tout le long de la chaîne alimentaire, depuis le portage animal jusqu'à la physiopathologie chez l'Homme et en passant par la contamination de l'aliment. Mon sujet de thèse s'intéresse au portage des EHEC par les bovins, qui représentent le principal réservoir de ces pathogènes, dans l'objectif de trouver des moyens de lutte contre les infections humaines à EHEC. En effet, diminuer le portage permettrait de réduire toutes les voies de contamination de l'Homme et de l'environnement. L'impact d'une telle diminution serait important puisque les EHEC représentent le quatrième agent responsable de toxi-infections alimentaires en Europe.

Les EHEC survivent et se multiplient dans le tractus digestif du ruminant sain et semblent bien adaptés à l'ensemble de cet écosystème complexe. Chez les ruminants, la survie, la multiplication et l'excrétion de ces bactéries sont transitoires et de nombreux facteurs sont associés à la variation de leur prévalence. L'excrétion des EHEC dans les matières fécales de l'animal conduit à la dissémination des EHEC dans la chaîne alimentaire de l'Homme et dans l'environnement de la ferme. L'Homme est contaminé par l'ingestion de produits alimentaires d'origine animale et végétale ou d'eau souillés par les fèces de bovins ou par contact direct avec les animaux. Ainsi, les bovins jouent un rôle important dans l'épidémiologie des infections humaines à EHEC. De plus, l'environnement de la ferme représente une niche écologique importante pour les EHEC. En effet, ces pathogènes survivent pendant de longues périodes dans les fèces animales et dans l'environnement de l'élevage et sont capables de résister à de nombreux stress environnementaux, contribuant à la contamination et recontamination des animaux et par conséquent aux infections humaines.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier (i) la physiologie des EHEC dans le tube digestif de l'animal en identifiant les principaux substrats utilisés pour leur croissance et leur survie dans ce biotope, (ii) leurs interactions avec le microbiote commensal du ruminant et (iii) les facteurs impliqués dans la persistance des EHEC dans les fèces bovines. Pour cela, nous avons étudié la physiologie de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 dans les compartiments digestifs du bovin *in vitro* par une approche RNA-Seq. Nous nous sommes également intéressés à une souche de terrain persistante, la souche STEC O157:H7 MC2, isolée par nos collègues de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Nous avons séquencé et analysé le génome de cette souche, et caractérisé son potentiel pathogène et sa physiologie dans les contenus digestifs bovins ainsi que ses capacités de persistance hors du tube digestif animal. Enfin, cette souche a été utilisée dans le cadre d'inoculations expérimentales de jeunes bovins, réalisées à l'ENVT, afin d'analyser *in vivo* ses propriétés de colonisation du tube digestif animal et son interaction avec le microbiote commensal des animaux.

Le manuscrit de thèse est organisé comme suit :

Une synthèse bibliographique composée de trois chapitres replace ce travail de thèse dans son contexte scientifique. Le premier chapitre rappelle les différents éléments de classification des souches EHEC parmi les souches *E. coli* pathogènes ainsi que leurs facteurs de virulence. Ce chapitre aborde également la physiopathologie des infections humaines à EHEC, les signes cliniques associés et les différents traitements qui peuvent être envisagés. Enfin, des données épidémiologiques en

France et au niveau mondial ainsi que les différentes voies de transmission des EHEC à l'Homme terminent ce chapitre. Le deuxième chapitre détaille les différentes espèces animales porteurs sains des STEC et se focalise sur la prévalence des STEC O157:H7 chez le bovin. Un second aspect de ce chapitre concerne les différents facteurs environnementaux et/ou de l'hôte animal impactant le portage des STEC par les bovins. Dans ce chapitre, l'écologie des STEC dans l'environnement de la ferme est également abordée, notamment leur capacité à persister dans l'environnement et à résister aux différents stress rencontrés en dehors du tube digestif animal. Le dernier chapitre est dédié aux processus bactériens permettant aux STEC/EHEC de survivre dans le tube digestif bovin. L'impact du microbiote intestinal du bovin sur le portage animal des STEC est également décrit. Enfin, ce dernier chapitre se termine sur les différentes stratégies envisagées pour contrôler le portage des STEC chez les ruminants. A la fin de cette synthèse bibliographique, les principaux objectifs de la thèse sont présentés.

Les résultats expérimentaux sont ensuite abordés sous la forme de trois chapitres, incluant les publications acceptées, soumises ou manuscrits à soumettre. Le premier chapitre est dédié à la mise en évidence de processus bactériens mis en place par la souche EHEC O157:H7 EDL933 pour survivre dans le tube digestif bovin. Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation phénotypique et génomique de la virulence et de la persistance dans le tube digestif bovin et dans l'environnement de la ferme de la souche STEC O157:H7 MC2, persistante dans les élevages français. Dans ce chapitre, le génome d'une souche *E. coli* commensale bovine a également été analysé et comparé avec d'autres souches *E. coli* dont des O157:H7. Le dernier chapitre porte sur le développement d'un modèle animal d'inoculation expérimentale avec la souche MC2, pour comprendre et maîtriser le portage digestif des EHEC chez les bovins. Ce mémoire se termine par une discussion générale dans laquelle sont exposées les perspectives de recherche, suivie de la liste des publications et communications réalisées au cours de la thèse.

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



## Chapitre I : Les *Escherichia coli* entérohémorragiques

### I.1. Généralités sur les *E. coli* entérohémorragiques

#### I.1.1. Définition et classification des EHEC

Le genre *Escherichia*, découvert en 1885 par le pédiatre autrichien-allemand Theodor Escherich, consiste en un bacille à Gram négatif aéro-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986). *Escherichia coli* (*E. coli*) est l'espèce prédominante de la flore commensale digestive anaérobie facultative du côlon de l'Homme et de nombreux animaux à sang chaud. La combinaison des antigènes de surface, flagellaires et capsulaires, déterminent environ 700 000 *E. coli* différents. Les *E. coli* sont majoritairement inoffensifs et sont en relation symbiotique avec l'hôte. Cependant, certaines souches d'*E. coli* ont acquis des facteurs de virulence leur conférant la capacité de s'adapter à de nouvelles niches écologiques et de causer des pathologies intestinales ou extra-intestinales chez des individus (Kaper *et al.*, 2004). Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux, appelés ExPEC, sont majoritairement responsables d'infections du tractus urinaire et du système nerveux central causées respectivement par les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* responsables de méningites néonatales (NMEC) (Bien *et al.*, 2012). Les *E. coli* pathogènes intestinaux sont capables de se multiplier, de persister dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte et d'induire des dommages cellulaires au niveau du tube digestif. Ces souches ont néanmoins développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques de gravité variable et ont été classées en sept pathotypes : *E. coli* entérotoxigènes (EPEC) ; *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) ; *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) ; *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) ; *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC) ; *E. coli* adhérents diffus (DAEC) ; *E. coli* adhérents invasifs (AIEC) (Croxen *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2016). D'autres pathotypes moins étudiés, également associés à des pathologies humaines, ont été décrits : les NTEC pour « Necrotoxigenic *E. coli* » et les CDEC pour « Cell-detaching *E. coli* ». Les *E. coli* peuvent être classés en 5 groupes phylogénétiques : A, B1, B2, D et E. Les *E. coli* commensaux appartiennent majoritairement au phylogroupe A, mais les différents pathotypes d'*E. coli* pathogènes sont répartis dans différents phylogroupes. Par exemple, les ExPEC appartiennent majoritairement aux groupes B2 et D, les ETEC sont principalement affiliés aux phylogroupes A et B1 alors que les EAEC appartiennent aux groupes A, B1, B2 et D (Clermont *et al.*, 2000; Croxen *et al.*, 2013).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) représentent un sous-ensemble des STEC (Figure 1) et sont définis par un tableau clinique pour désigner les souches hautement pathogènes responsables de colites hémorragiques et/ou du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'Homme. Toutes les souches STEC ne sont donc pas forcément associées à une pathologie chez l'Homme. Les souches EHEC sont capables d'induire des lésions de l'endothélium vasculaire principalement intestinal, rénal et cérébral (O'Loughlin *et al.*, 2001). Ces lésions résultent de l'action des Shiga-toxines (Stx), codées par les gènes *stx*, qui constituent le principal facteur de virulence de ces pathogènes. Les EHEC représentent un problème de santé publique en raison de l'extrême sévérité des manifestations cliniques, parfois mortelles, qu'ils engendrent, notamment chez les jeunes enfants et les personnes âgées.





En 2008, en France, l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a défini les 5 sérotypes les plus fréquemment associés à des épidémies et à des pathologies (colite hémorragique et SHU) entre les années 1996 et 2006, classés ici selon leur importance : O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 et O111:H8. Ces souches sont appelées « EHEC du top 5 » ou « EHEC typiques majeurs » et sont considérées comme hautement pathogènes (AFSSA, 2008, 2010). Toutes ces souches sont positives pour les gènes *stx* et *eae* et les marqueurs génétiques associés à l'îlot de pathogénicité OI-122. Par ailleurs, elles appartiennent aux sérotypotypes A et B définis par Karmali (Karmali *et al.*, 2003). De manière générale, les EHEC typiques majeurs présentent des caractéristiques moléculaires et des facteurs ou marqueurs de virulence particuliers au sein d'une même souche, ce qui permet d'estimer son caractère pathogène. Ainsi, d'après l'ANSES, une souche STEC détectée dans la chaîne alimentaire, en dehors d'un contexte clinique, qui présente les mêmes caractéristiques qu'un EHEC typique (présence des gènes de virulence *stx* et *eae*), est considérée comme « pathogène » alors qu'elle est considérée comme « hautement pathogène » quand elle appartient aux EHEC typiques majeurs (AFSSA, 2010). Aux États-Unis, le « U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service » (USDA) a recensé 6 sérogroupes, en plus du O157, majoritairement impliqués dans des cas de pathologies sévères entre les années 1983 et 2002. Il s'agit des sérogroupes O26, O111, O103, O121, O45 et O145 aussi appelés « Big 6 » (Brooks *et al.*, 2005). Toutes ces souches sont positives pour les gènes *eae* et *stx*. Cependant, des cas d'infections à EHEC atypiques ont déjà été rapportés. C'est le cas d'une souche *E. coli* O104:H4 responsable d'une épidémie sévère survenue en Allemagne en 2011 qui produit une Shiga-toxine mais ne possède pas l'îlot de pathogénicité LEE (Bielaszewska *et al.*, 2011). La caractérisation de cette souche a montré que son génome était similaire à celui des souches EAEC. Elle possède l'opéron AAF (Aggregative Adherent Fimbriae) qui est une caractéristique propre aux EAEC. Les caractéristiques génomiques de cette souche ont permis de définir un nouveau pathotype d'*E. coli*, les EAHEC pour « enteroaggregative hemorrhagic *E. coli* » (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

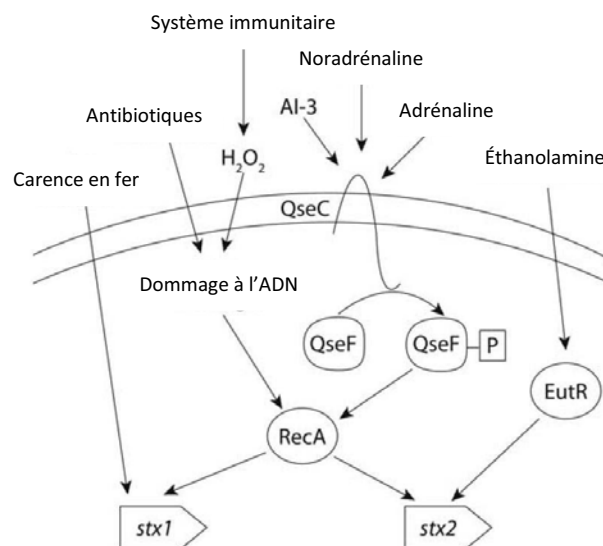
### I.1.2. Les facteurs de virulence des EHEC

#### I.1.2.1. Les Shiga-toxines

Les Shiga-toxines (Stx) sont considérées comme le principal facteur de virulence des EHEC. Les toxines Stx sont également connues sous le nom de Vérotoxines en raison de leur cytotoxicité sur les lignées cellulaires Vero dérivant de cellules épithéliales rénales de singe africain. La pathogénicité des EHEC dépend de la production des toxines Stx qui sont responsables des effets cliniques, notamment les colites hémorragiques et le SHU. Les toxines Stx sont des exotoxines présentant une parenté avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* de type I. Elles ont été classées en deux groupes majeurs : Stx1 et Stx2 (Kruger & Lucchesi, 2015). Pour chaque groupe de toxine Stx, plusieurs variants ont été identifiés (Kruger & Lucchesi, 2015). D'autres espèces bactériennes comme *Acinobacter haemolyticus*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae* produisent également les toxines Stx (Scheutz *et al.*, 2012).

I.1.2.1.1. Les phages *stx*

Les gènes *stx*, codant les Shiga-toxines, sont portés sur un opéron localisé sur le génome d'un phage inducible et lysogénique similaire au bactériophage  $\lambda$ , appelé phage *stx*. Les gènes codant Stx1 et Stx2 sont portés par des phages distincts ayant un processus d'induction similaire (Mellies *et al.*, 2014). Au stade lysogénique, le phage *stx* est intégré dans le chromosome bactérien sous la forme d'un prophage et l'expression des gènes *stx* est inhibée. Dans le chromosome bactérien, les phages *stx* peuvent s'insérer au niveau d'un site préférentiel unique ou d'autres sites d'intégration secondaires (Serra-Moreno *et al.*, 2007). Dans certaines conditions, le prophage est induit (stade lytique) et les gènes portés par le phage sont exprimés. Ainsi, l'expression des gènes *stx* est sous le contrôle du promoteur du phage et de l'antitermineur Q (Wagner *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2001). L'induction des prophages *stx*, et donc la production de Stx, est contrôlée par des molécules signal, dont RecA, un régulateur du système SOS (Figure 2). Par exemple, lors d'une infection chez l'Homme, un stress oxydatif qui survient au niveau de l'intestin participe à l'activation de RecA et donc à l'induction des prophages *stx* (Los *et al.*, 2010). Le traitement des infections humaines à EHEC par des antibiotiques ciblant la synthèse d'ADN peut avoir de graves conséquences cliniques en raison de l'effet de certains antibiotiques sur l'induction du phage *stx* et la production de Stx (Zhang *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'adrénaline, la noradrénaline ou l'auto-inducteur 3 (AI-3), une molécule du quorum sensing produite par les bactéries du microbiote intestinal, activent RecA par un mécanisme dépendant du système Qse (quorum sensing *E. coli*) (Moreira *et al.*, 2016; Reading *et al.*, 2009). D'autres facteurs comme la carence en fer et la présence d'éthanolamine peuvent favoriser l'expression des gènes *stx1* et *stx2*, respectivement (Kendall *et al.*, 2012; Mellies & Lorenzen, 2014).



**Figure 2 : Induction de la production des Shiga-toxines Stx1 et Stx2**, adaptée de Mellies & Lorenzen (2014).

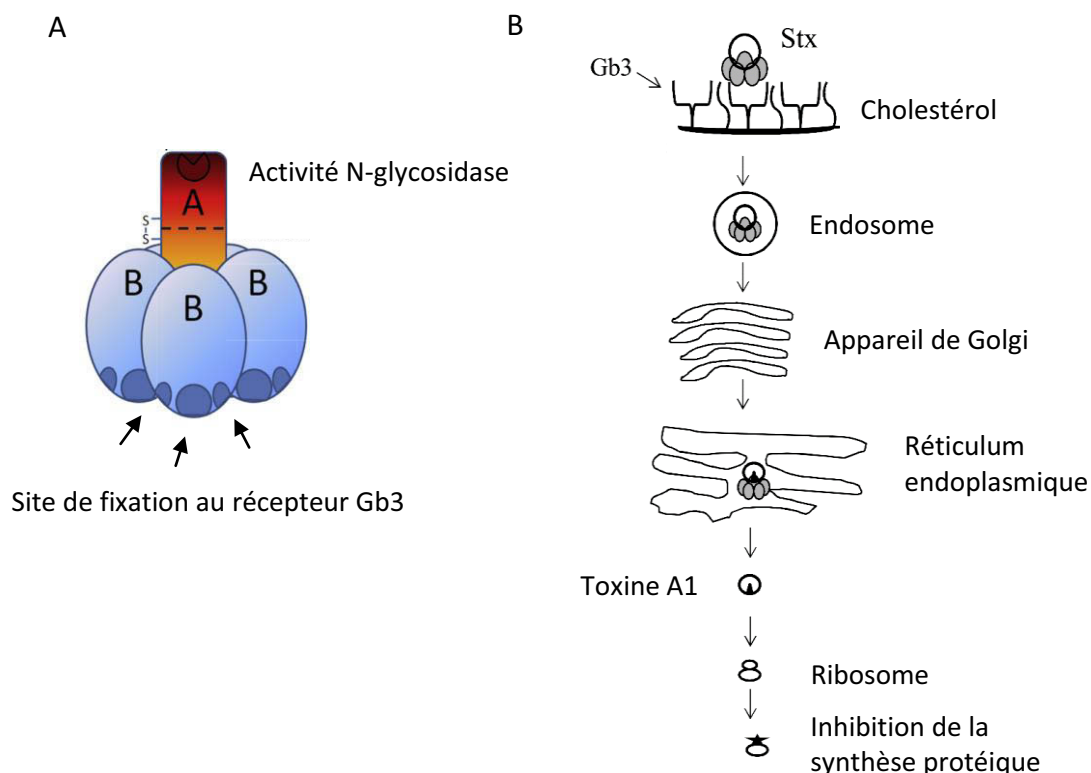
Le prophage *stx* au stade lysogénique module l'expression de certains gènes de la bactérie hôte, comme par exemple une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la mobilité ou l'inhibition de l'expression de l'appareil de sécrétion de type III (Su *et al.*, 2010; Tozzoli *et al.*, 2014). Cette inhibition est due à une région régulatrice présente sur le génome du phage *stx* et principalement retrouvée chez les souches de sérotype O157 isolées de cas cliniques. Chez les souches O157, la présence d'une région codant pour l'antitermineur transcriptionnel Q933 a été

associée à une expression élevée des gènes *stx* (Steyert *et al.*, 2012). De plus, les phages *stx* peuvent réguler différentes étapes de l'interaction des EHEC avec l'épithélium intestinal, comme l'augmentation de l'expression de la nucléoline, un des récepteurs de l'intimine (Robinson *et al.*, 2006).

Les phages *stx* représentent des éléments génétiques mobiles et sont considérés comme vecteurs des gènes *stx*. La transmission des phages *stx* peut avoir lieu au cours du transit intestinal mais aussi dans l'eau, les aliments, via les fèces ou encore les biofilms (Imamovic *et al.*, 2009; Solheim *et al.*, 2013).

#### I.1.2.1.2. Structure et mode d'action des Shiga-toxines

Les toxines Stx sont composées d'une sous-unité A liée de façon non covalente à 5 sous-unités B identiques formant un pentamère (protéine de type AB<sub>5</sub>) (Figure 3). La sous-unité A est composée de deux parties, A1 et A2, reliées entre elles par un pont disulfure. Le peptide A1 possède l'activité enzymatique N-glycosidase alors que les sous-unités B permettent l'interaction de la toxine avec son récepteur, le globotriaosylcéramide Gb3 présent à la surface des cellules endothéliales de l'intestin, du rein et du cerveau chez l'homme (Bauwens *et al.*, 2013). Pour exercer son activité N-glycosidase, le peptide A1 doit être libéré dans le cytosol de la cellule cible.



**Figure 3 : Structure (A) et mode d'action des Shiga-toxines (B)**, adaptée de Bryan *et al.* (2015); Melton-Celsa (2014). La toxine Stx, composée d'une sous-unité A et d'un pentamère de sous-unités B, se fixe au récepteur Gb3 et est internalisée dans l'endosome. Le complexe Stx/Gb3 migre par un transport rétrograde vers l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique dans lequel le peptide A1 est libéré pour atteindre les ribosomes et engendrer un arrêt de la synthèse protéique.

Bien que la protéine Stx2 ne présente que 60% d'homologie avec Stx1, les deux toxines ont un mode d'action identique (Melton-Celsa, 2014; Sandvig *et al.*, 2010). Au niveau du site de colonisation intestinal des EHEC, les toxines Stx sont relarguées lors de la lyse bactérienne et rejoignent la circulation sanguine par translocation des cellules épithéliales intestinales, dépourvues de Gb3, du pôle apical vers le pôle basal sans activité cytotoxique. Les toxines Stx atteignent les cellules endothéliales cibles du côlon, du rein et du cerveau et se fixent sur le récepteur Gb3 (O'Loughlin & Robins-Browne, 2001). Il existe deux sites de fixation de la sous-unité B qui ont une forte affinité avec le récepteur Gb3 alors que le troisième site de fixation semble être important pour le recrutement des récepteurs à la surface des cellules. Après fixation de la toxine au récepteur Gb3, le complexe Stx/Gb3 est internalisé dans la cellule cible par un mécanisme d'endocytose puis fusionne avec l'endosome (Figure 3). Le complexe rejoint l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique (RE) par un transport rétrograde (Sandvig *et al.*, 2010). Dans le RE, le pont disulfure entre les peptides A1 et A2 est réduit et seul le peptide A1 est libéré et quitte le RE pour atteindre l'enveloppe nucléaire puis les ribosomes cibles (Figure 3). L'activité N-glycosidase du peptide A1 retire un résidu adénine de l'ARN ribosomique 28S du ribosome 60S, ce qui entraîne la dissociation du ribosome avec le facteur d'élongation 1, conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique (Spooner *et al.*, 2012). Il a également été montré que les toxines Stx sont capables d'induire l'apoptose de différents types cellulaires (Tesh, 2010).

#### I.1.2.1.3. Les sous-types de Shiga-toxines

Comme indiqué ci-dessus, deux grands groupes de toxines, Stx1 et Stx2, et de nombreux variants ont été identifiés. Ils se distinguent par leur différence d'activité biologique, de réactivité immunologique, de reconnaissance de leur récepteur au niveau des cellules cibles et de leur capacité à être activés par l'élastase du mucus intestinal (Scheutz, 2014). Scheutz *et al.* (2012) ont développé un système basé sur les séquences des toxines Stx afin de standardiser la nomenclature des différents variants (Scheutz *et al.*, 2012). Le groupe des toxines Stx1 inclut les variants Stx1a, Stx1c et Stx1d, alors que celui des toxines Stx2 est plus hétérogène et comprend les variants Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f et Stx2g. Le type de variant reflète à la fois l'origine des souches et leur pouvoir pathogène. Certains variants semblent associés à des hôtes spécifiques et pourraient influencer directement la virulence des souches (Friedrich *et al.*, 2002). Par exemple, les variants Stx2a, Stx2c et Stx2d ont été fréquemment associés à des souches hautement pathogènes et à l'apparition du SHU, alors que les variants Stx1 et Stx2e, Stx2f et Stx2g sont plus rarement impliqués dans des cas d'infections humaines (Kawano *et al.*, 2008). Les différents profils des variants de Stx sont considérés comme un facteur prédictif de la sévérité des infections à EHEC.

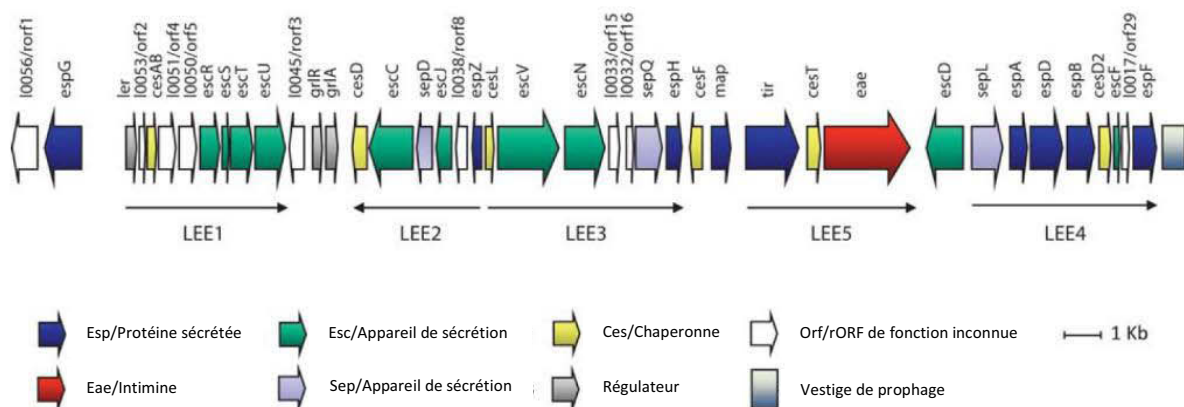
#### I.1.2.2. Le locus d'effacement des entérocytes

Les EHEC typiques ont la capacité de former des lésions d'attachement/effacement (A/E) à la surface apicale des entérocytes. Ces lésions se caractérisent par une adhésion intime de la bactérie aux cellules intestinales, un effacement des microvillosités intestinales et la formation d'un piédestal du côté apical de la cellule intestinale. Ces caractéristiques résultent de l'action combinée de facteurs de virulence qui induisent des réarrangements du cytosquelette de la cellule eucaryote cible favorisant ainsi la colonisation des EHEC aux cellules intestinales. Ces facteurs de virulence sont codés par des

gènes portés par un îlot de pathogénicité chromosomique appelé Locus d'Effacement des Entérocytes (LEE) qui est conservé chez les AEEC.

#### I.1.2.2.1. Structure du locus d'effacement des entérocytes

Le LEE des EHEC a une taille de 43 Kb et contrairement aux EPEC, contient à son extrémité terminale des séquences du phage cryptique P4 d'une taille de 7,5 Kb (Perna *et al.*, 1998). Le LEE se compose de 5 opérons, de *LEE1* à *LEE5*, et contient 41 gènes. Il est organisé en 3 parties majeures qui codent (i) l'appareil de sécrétion de type III (AST3), (ii) l'intimine et son récepteur Tir (Translocated intimin receptor) et (iii) les protéines sécrétées par l'AST3 (Stevens *et al.*, 2014). L'organisation génétique du LEE d'une souche EHEC O157:H7 est représentée en Figure 4.



**Figure 4 :** Organisation génétique du LEE d'une souche EHEC O157:H7, adaptée de Stevens & Frankel (2014).

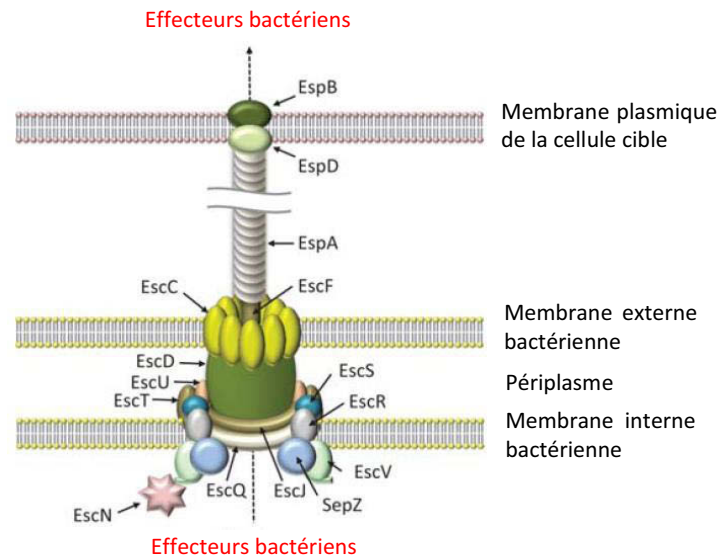
La régulation du LEE au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel est complexe et fait intervenir de nombreux régulateurs. Le régulateur transcriptionnel Ler (LEE-encoded regulator), codé par le gène *ler* porté par l'opéron *LEE1*, permet l'expression des opérons *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* et *LEE5* en réponse à différents signaux comme le quorum sensing ou la carence nutritionnelle (Elliott *et al.*, 2000; Mellies & Lorenzen, 2014).

#### I.1.2.2.2. L'appareil de sécrétion de type III

L'AST3 est une structure macromoléculaire apparentée à une seringue qui permet l'injection d'environ 50 effecteurs bactériens directement du cytoplasme de la bactérie au cytosol de la cellule cible sans passage par le milieu extérieur (Gaytan *et al.*, 2016; Tobe *et al.*, 2006). Il est composé d'un corps basal inséré dans la double membrane bactérienne et est associé à une ATPase cytoplasmique. L'ATPase, codée par le gène *escN*, fournit l'énergie nécessaire à l'AST3 pour assurer la sécrétion de protéines appelées Esp (*E. coli* secreted protein). L'AST3 est également composé d'un polymère formant une aiguille. L'aiguille est associée à une structure filamenteuse creuse (filament EspA) qui permet la sécrétion de protéines formant le translocon (EspBD) dans la membrane plasmique de la cellule cible (Kresse *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2003). Ce système permet ainsi la translocation d'effecteurs bactériens directement dans le cytosol de la cellule cible. La structure de l'AST3 est représentée en Figure 5.

Les effecteurs bactériens, dont Tir, perturbent les processus cellulaires de la cellule au profit du pathogène (Stevens & Frankel, 2014). Une fois dans la cellule cible, le récepteur Tir s'insère dans la

membrane plasmique et interagit avec l'intimine localisée à la surface de la bactérie. Cette interaction déclenche une voie de signalisation conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'actine et à la formation du piédestal (Mellies & Lorenzen, 2014). Le LEE des EHEC n'est pas suffisant à la formation des lésions A/E. De nombreux effecteurs non codés par le LEE ont également été identifiés comme, par exemple, l'effecteur EspFu (Campellone *et al.*, 2004). Dans la cellule cible, ce dernier est connu pour interagir avec le récepteur Tir et stimuler la polymérisation de l'actine permettant la formation du piédestal (Campellone *et al.*, 2004).



**Figure 5 : Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III**, adaptée de Stevens & Frankel (2014).

L'assemblage de l'AST3 et la translocation des effecteurs sont régulés de façon spatiotemporelle afin d'établir l'infection et d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Les opérons *LEE2* et *LEE4* contiennent des gènes codant pour les protéines SepD et SepL (Secretion of EHEC proteins D et L), respectivement, qui permettent le « switch » de la sécrétion des translocateurs vers la translocation des effecteurs et par conséquent la régulation de la sécrétion des protéines EspABD nécessaires à la formation du filament et du translocon (Deng *et al.*, 2005). Par ailleurs, la protéine SepZ, impliquée dans la régulation de la translocation des effecteurs bactériens dans le cytoplasme de la cellule eucaryote, empêche l'injection incontrôlée des effecteurs permettant le maintien de la viabilité de la cellule infectée (Berger *et al.*, 2012). Ces régulations sont essentielles à la colonisation et à l'infection des cellules intestinales par les EHEC.

#### 1.1.2.2.3. L'intimine

L'intimine est une adhésine de 94 à 97 kDa codée par le gène *eae* et localisée au niveau de la membrane externe bactérienne. Elle est composée de deux parties : la région N-terminale ancrée dans la membrane externe de la bactérie et la région C-terminale variable permettant l'interaction avec le récepteur Tir à la surface des cellules épithéliales. En fonction de la séquence de la région C-terminale de l'intimine, 29 variants d'intimine ont été identifiés. Ils sont impliqués dans le tropisme cellulaire, la spécificité d'hôte et donc dans le pouvoir pathogène des EHEC (Fitzhenry *et al.*, 2002). En effet, le variant  $\gamma$ , principalement retrouvé chez les souches EHEC O157:H7, possède un tropisme cellulaire pour l'épithélium intestinal associé aux plaques de Peyer (Fitzhenry *et al.*, 2002). Les

variants  $\alpha$  et  $\beta$  sont souvent associés aux EPEC mais le variant  $\beta$  est également fréquemment retrouvé parmi les EHEC de sérotype non-O157 (Lai *et al.*, 2013). De plus, les variants  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont capables d'interagir avec la nucléoline, favorisant l'attachement initial entre les bactéries et les cellules cibles. L'intimine  $\alpha$  peut également se fixer aux  $\beta_1$ -intégrines, bien que celles-ci ne soient pas requises pour l'adhésion des EHEC (Sinclair *et al.*, 2004).

#### 1.1.2.3. Les autres facteurs d'adhésion des EHEC non codés par le LEE

Chez les EHEC, de nombreuses adhésines fimbriaires et non fimbriaires contribuent à l'adhésion, à l'établissement et à la persistance de l'infection (McWilliams *et al.*, 2014).

Différentes adhésines fimbriaires ont été décrites:

- Le fimbriae Lpf (Long polar fimbriae) contribue à l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales, au niveau des cellules M (Cordonnier *et al.*, 2017a), mais aussi aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV (Farfan *et al.*, 2011). Comme l'intimine, ce fimbriae semble influencer le tropisme cellulaire pour l'épithélium associé aux plaques de Peyer (Cordonnier *et al.*, 2017a; Fitzhenry *et al.*, 2006).
- Le pilus ECP (*E. coli* common pilus) et les fimbriae F9, ELF (*E. coli* laminin-binding-fimbriae) et Sfp (Sorbitol-fermenting fimbriae protein) permettent l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales *in vitro* (McWilliams & Torres, 2014; Rendon *et al.*, 2007). De plus, le pilus ECP et les fimbriae F9 et ELF sont également capables d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire (Low *et al.*, 2006; McWilliams & Torres, 2014). Il a également été montré que le pilus ECP et le fimbriae Sfp étaient exprimés dans des conditions limitées en oxygène, conditions retrouvées dans le tube digestif.
- Le pilus de type IV HCP pour « hemorrhagic *coli* pilus » est impliqué dans l'adhésion des EHEC à de nombreux types cellulaires ainsi que dans l'invasion des cellules épithéliales, l'hémagglutination des érythrocytes, la formation de biofilm et la réponse pro-inflammatoire. Ces propriétés suggèrent que ce pilus contribue non seulement à la virulence, la survie et la transmission des EHEC mais aussi à l'inflammation causée par les EHEC (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009a).
- Le fimbriae de type I, capable de se lier au mannose, a souvent été associé à la virulence des souches *E. coli* et semble important pour la colonisation de l'épithélium intestinal. Cependant, son rôle dans la pathogénicité des EHEC n'a jamais été démontré (Iida *et al.*, 2001). De plus, la majorité de souches EHEC O157:H7 n'est pas capable d'exprimer ce fimbriae contrairement aux sérogroupes O26 et O118 (Iida *et al.*, 2001; Roe *et al.*, 2001; Shaikh *et al.*, 2007). En effet, chez les souches *E. coli* de sérotype O157:H7, il existe une délétion de 16 paires de base (pb) dans la région régulatrice qui contrôle l'expression du fimbriae.

Les adhésines non fimbriaires incluent des protéines ayant la capacité d'être sécrétées, appelées autotransporteurs.

- Les autotransporteurs EhaA et EhaB sont impliqués dans la formation de biofilms. De plus, EhaA est impliqué dans l'autoagrégation et EhaB dans l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène I et la laminine (Wells *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 2008).
- Deux autres autotransporteurs, les adhésines Saa (STEC autoagglutination adhesin) et Sab (STEC autotransporter contributing to biofilm formation), ont été identifiés chez les EHEC atypiques (ne possédant pas le LEE) et sont impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales humaines et dans la formation de biofilms. Ces deux adhésines peuvent ainsi contribuer à la colonisation des cellules de l'hôte par des EHEC qui n'ont pas la capacité de former des lésions A/E (Herold *et al.*, 2009; Paton *et al.*, 2001).
- Le dernier autotransporteur décrit, nommé Cah (calcium binding antigen 43 homologue), est impliqué dans l'autoagrégation et dans la formation de biofilm. Cependant, son rôle dans la pathogénicité des EHEC reste à démontrer (Torres *et al.*, 2002).

D'autres adhésines non fimbriaires potentiellement impliquées dans la colonisation et/ou dans la pathogénèse des EHEC ont été identifiées. C'est le cas de l'adhésine Iha, présente chez les souches O157:H7 et absente chez les autres souches mais dont le rôle dans la virulence n'a pas été démontré (Tarr *et al.*, 2000). La protéine OmpA (Outer membrane protein A), présente chez les souches *E. coli* pathogènes et commensales, semble être importante pour l'adhésion *in vitro* des EHEC O157:H7 aux cellules épithéliales humaines (Torres *et al.*, 2003).

D'autre part, des structures comme le curli et le flagelle ont également été identifiées comme étant des facteurs d'adhésion des EHEC (McWilliams & Torres, 2014).

- Le curli interagit plus spécifiquement avec des protéines de la matrice extracellulaire et son expression est induite par de multiples signaux environnementaux comme le pH, la température et la carence nutritionnelle. Le curli a également un rôle dans l'adhésion et la formation de biofilms des EHEC aux végétaux. Dans certaines conditions, il a également un rôle de protection des pathogènes contre les antiseptiques chimiques soit en formant une barrière physique autour des bactéries soit en induisant la formation de biofilms (Ryu *et al.*, 2005).
- Le flagelle, associé dans un premier temps à la motilité bactérienne, a également été identifié comme un facteur d'adhésion aux cellules épithéliales humaines. Après contact avec l'épithélium, l'expression du flagelle est réduite, suggérant que ce dernier intervient dans les étapes précoces d'adhésion (Mahajan *et al.*, 2009). De plus, le flagelle des EHEC est capable d'interagir avec une protéine de la mucine Muc2 (Erdem *et al.*, 2007).

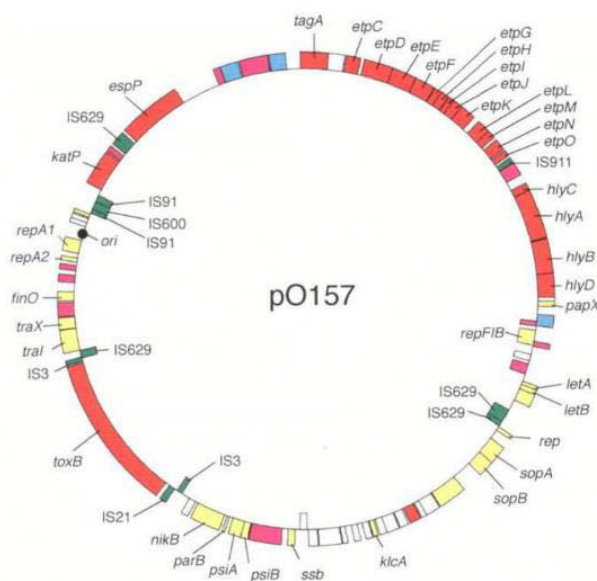
### I.1.3. Les autres facteurs de virulence potentiels des EHEC

L'adhésion et la colonisation intestinale ainsi que la production de Shiga-toxines sont considérées comme essentielles à l'établissement de l'infection par les EHEC. Cependant, d'autres facteurs sont impliqués dans la pathogénèse des EHEC.



## I.1.3.1. Le plasmide de virulence des EHEC

Toutes les souches EHEC O157:H7 isolées de cas cliniques possèdent un plasmide de virulence appelé pO157, dont la taille varie de 93 Kb à 104 Kb (Figure 6). Ce plasmide est aussi présent chez les souches O26:H11. Il contient une centaine de gènes, parmi lesquels 35 sont potentiellement impliqués dans la virulence des EHEC. Les gènes portés par le plasmide codent, entre autres, une hémolysine (Ehx), une catalase peroxydase (KatP), un système de sécrétion de type II (Etp), une sérine protéase (EspP), une adhésine putative (ToxB) et une métalloprotéase (StcE) (Levine *et al.*, 1987; Lim *et al.*, 2010).



**Figure 6 : Représentation circulaire du plasmide pO157 d'une souche EHEC O157:H7** (Makino *et al.*, 1998). Les gènes portés par le plasmide pO157 ont été classés en six catégories : (i) les facteurs de virulence (rouge), (ii) les facteurs de transfert et de maintien du plasmide (jaune), (iii) les séquences d'insertion (vert), (iv) autres fonctions (bleu), (v) gènes hypothétiques (violet) et (vi) gènes sans fonction assignée (blanc).

- Le gène *ehxA* d'une taille de 3,4 Kb, codant l'hémolysine Ehx, est porté par le pO157. De nombreuses études ont montré que cette hémolysine était conservée parmi les souches de sérotypes O157:H7 et non-O157 les plus fréquemment associés à des cas de SHU (Lim *et al.*, 2010). L'hémolysine appartient à la famille des toxines RTX (repeats-in-toxin) qui sont sécrétées par un appareil de sécrétion de type I et forment des pores dans les membranes des érythrocytes et d'autres cellules eucaryotes cibles. Deux types d'hémolysine ont été décrits : la forme libre qui a la capacité de lyser les cellules endothéliales des micro-vaisseaux du cerveau humain et la forme associée aux vésicules membranaires qui est internalisée dans les cellules épithéliales intestinales et endothéliales afin de déclencher l'apoptose (Bielaszewska *et al.*, 2014).
- La catalase peroxydase KatP est codée par le gène *katP* conservé au sein des souches EHEC O157:H7 et d'autres souches STEC. C'est une enzyme localisée dans le cytoplasme et le

périplasme bactériens qui permet aux bactéries de résister au stress oxydatif. La protéine KatP va dégrader le peroxyde d'hydrogène, permettant la libération d'oxygène. Ainsi, cette enzyme semble favoriser la colonisation et la survie des EHEC dans le tube digestif, environnement pauvre en oxygène, en permettant l'utilisation de ce dernier comme substrat dans la chaîne respiratoire (Lim *et al.*, 2010; Uhlich, 2009).

- L'autotransporteur EspP possédant une activité sérine protéase, semble être impliqué dans la virulence des EHEC et particulièrement dans le développement de la colite hémorragique et du SHU. En effet, EspP clive et réduit l'activité de plusieurs facteurs de coagulation engendrant des troubles de la coagulation qui peuvent faciliter le passage des Shiga-toxines dans la circulation sanguine au niveau du site de colonisation de l'épithélium intestinal. D'autres rôles ont été décrits pour la protéase EspP. Elle est capable de cliver des protéines du complément, protégeant ainsi les pathogènes de l'opsonisation (Orth *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que des monomères d'EspP peuvent s'assembler et former un filament (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2010). Ce filament protège les bactéries des antibiotiques et des détergents, contribue à la formation de biofilms et présente des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales résultant d'un effet cytopathique. Ainsi, EspP semble favoriser l'adhésion et la colonisation des EHEC à l'épithélium intestinal et augmenter la sévérité de l'infection.
- La métalloprotéase StcE est sécrétée par l'appareil de sécrétion de type II Etp. Grys *et al.* (2005) ont démontré *in vitro* que StcE favorisait l'adhésion intime des souches O157:H7 aux cellules épithéliales en clivant des glycoprotéines de surface telles que la mucine. En effet, l'activité mucinase de StcE permettrait aux pathogènes d'une part de se rapprocher de l'épithélium intestinal et d'autre part d'augmenter la disponibilité des nutriments (Grys *et al.*, 2005).
- Le gène *toxB* de 9,5 Kb, codant une adhésine putative ToxB, est porté par le pO157. ToxB contribue à l'adhésion des EHEC O157:H7 en stimulant la production et la sécrétion des protéines sécrétées par l'AST3, telles que EspA, EspB et Tir, requises pour l'adhésion intime des bactéries aux entérocytes (Tatsuno *et al.*, 2001).

#### I.1.3.2. Les îlots génomiques

Les îlots génomiques O (OI pour « O Island ») sont des groupes de gènes localisés dans le chromosome bactérien acquis par transfert horizontal. Ces îlots génomiques sont présents chez les souches EHEC, dont les O157:H7, et absents chez les *E. coli* non pathogènes. Au total, 177 îlots ont été identifiés chez les EHEC O157:H7 dont certains contiennent des gènes de virulence (Perna *et al.*, 2001). Ces îlots regroupent des gènes codant pour des effecteurs de type III appelés Nle (non LEE-encoded factor), dont la distribution est variable d'une souche à l'autre (Tobe *et al.*, 2006). Au total, 14 gènes *nle* ont été identifiés comme étant plus fréquemment présents chez les souches EHEC que chez les souches STEC (Coombes *et al.*, 2008). L'OI-122 contient au moins six gènes de virulence (*pagC*, *sen*, *nleB*, *nleE*, *efa1* et *efa2*) (Karmali *et al.*, 2003; Wickham *et al.*, 2006).

*Conclusion I.1. : Les EHEC représentent un sous-type de STEC hautement pathogène pour l'Homme. L'ANSES a défini cinq EHEC majeurs comme étant les plus impliqués dans les infections à EHEC en France. Ces souches possèdent les principaux facteurs de virulence. Toutefois, le sérotype O157:H7*

reste le plus incriminé dans les cas sporadiques et les épidémies dans le monde. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur les EHEC de sérotype O157:H7.

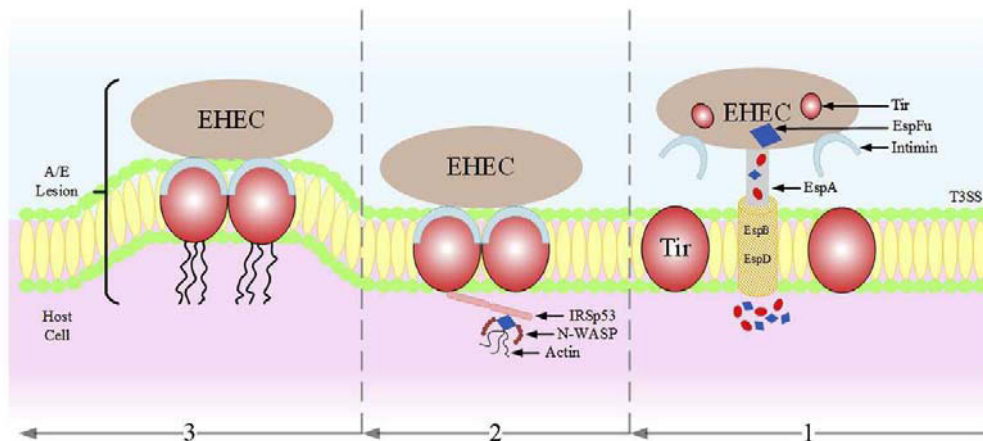
## I.2. Physiopathologie des infections humaines à EHEC

### I.2.1. Résistance à l'acidité gastrique

Une fois ingérés, les EHEC doivent résister à l'environnement acide de l'estomac (pH2 à pH6) afin d'atteindre l'intestin. Les EHEC sont capables de survivre aux pH acides des sécrétions gastriques grâce à des systèmes de résistance (Zhao *et al.*, 2010). Trois systèmes majeurs ont été décrits. Le premier est un système réprimé par le glucose dont le mécanisme par lequel la bactérie est protégée de l'acidité est peu connu. Les deux autres systèmes sont dépendants de la présence de certains acides aminés. Lorsque le pH interne devient acide, les glutamates décarboxylases, GadA et GadB, et l'arginine décarboxylase AdiA catalysent la décarboxylation du glutamate et de l'arginine en GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et en agmatine, respectivement. Cette réaction consomme un proton recruté dans le cytoplasme bactérien et produit du CO<sub>2</sub>. Le GABA et l'agmatine sont ensuite excrétés dans le milieu extérieur par les transporteurs spécifiques GadC et AdiC, respectivement. La consommation continue de protons intracellulaires au cours des cycles successifs de décarboxylation entraîne une augmentation du pH protégeant ainsi les composants cellulaires de l'acidité. Un quatrième système de résistance à l'acidité faisant intervenir la lysine et l'ornithine décarboxylase a été décrit mais s'avère beaucoup moins efficace (Iyer *et al.*, 2003). Ces voies de résistance à l'acidité sont placées sous le contrôle de régulateurs qui permettent à la bactérie de régler finement sa réponse à cet environnement extrême. Les chaperones périplasmiques HdeA et HdeB sont impliquées dans la réponse de la bactérie au stress acide en protégeant les protéines bactériennes d'une agrégation due à des pH très bas (Carter *et al.*, 2012). Le quorum sensing a également un rôle important dans le contrôle de la tolérance à l'acidité des EHEC (Mellies & Lorenzen, 2014).

### I.2.2. Adhésion et colonisation intestinale

Une fois dans l'intestin humain, les EHEC adhèrent et colonisent principalement la partie distale de l'intestin grêle et le côlon avec un tropisme pour l'épithélium intestinal associé aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer (Chong *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2015). Les adhésines assurent d'abord l'adhésion à distance puis les EHEC forment un attachement intime avec les cellules épithéliales intestinales grâce à l'interaction entre l'intimine et son récepteur Tir (Figure 7). Le cholestérol joue un rôle important dans la translocation des protéines via l'AST3 et dans la formation des lésions A/E et du piédestal (Riff *et al.*, 2005). Il a été montré que les EHEC sont également capables de traverser l'épithélium intestinal au niveau des cellules intestinales M des plaques de Peyer, de survivre et de libérer les toxines Stx dans les macrophages, favorisant ainsi le transport des toxines au travers de la barrière intestinale (Etienne-Mesmin *et al.*, 2011). De plus, l'expression de facteurs de virulence comme les Stx et l'AST3 peut être activée par des processus de quorum sensing, favorisant la colonisation (Kendall *et al.*, 2016).



**Figure 7 : Adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales et formation des lésions A/E (Saeedi *et al.*, 2017).**

### 1.2.3. Les signes cliniques

Les infections à EHEC peuvent être asymptomatiques mais également engendrer de nombreuses complications allant de diarrhées aqueuses et sanglantes jusqu'à des pathologies beaucoup plus sévères comme le SHU, principalement chez l'enfant mais aussi chez le sujet âgé, et le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte. La colite hémorragique est la principale manifestation suite à une infection à EHEC (AFSSA, 2003).

Après l'ingestion des EHEC, une période d'incubation de trois à quatre jours est observée avant le développement de la diarrhée. Il a été estimé que 10 à 100 bactéries étaient suffisantes pour provoquer une infection. La diarrhée est causée par l'effacement des microvillosités intestinales, la dérégulation du système de transport des ions et du glucose, l'inhibition des canaux d'absorption de l'eau et la rupture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal (Wong *et al.*, 2011). Elle peut être accompagnée de fièvre, de crampes abdominales et de nausées. Dans 80-90% des cas, la diarrhée aqueuse évolue vers une colite hémorragique en raison de l'altération tissulaire due aux toxines. La majorité des patients est rétablie au bout d'une semaine sans séquelle. L'hospitalisation, de 6 à 14 jours en moyenne, est néanmoins requise pour 35% des patients présentant une diarrhée hémorragique. Bien que la plupart des patients recouvrent la santé, 15% développent un SHU au bout de 7 jours (Bryan *et al.*, 2015). Le SHU est caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, une insuffisance rénale aigüe ainsi que des atteintes neurologiques dans les cas les plus graves (Karpman *et al.*, 2017). C'est la principale cause d'insuffisance rénale chez l'enfant de moins de cinq ans. Dans 50% des cas, la dialyse est requise au cours de la phase aigüe et la mortalité peut atteindre 5% des cas (1% en France). Le SHU survient chez 15% des enfants de moins de 10 ans et chez 15% des personnes âgées de plus de 60 ans après une infection à EHEC (AFSSA, 2003).

Le PTT touche surtout l'adulte. Il est caractérisé, comme le SHU, par une anémie hémolytique, une thrombocytopénie et des atteintes nerveuses. Une atteinte rénale peut éventuellement survenir (Saha *et al.*, 2017). Les atteintes nerveuses du PTT se caractérisent par une modification du comportement, des convulsions, des accidents cardio-vasculaires, un coma puis la mort dans 10% des cas. Les manifestations peuvent être expliquées par une agrégation plaquettaire et des dépôts de fibrine localisés au niveau des artérioles. Le PTT peut durer quelques jours à quelques semaines mais

peut parfois se prolonger pendant des mois. Les atteintes nerveuses et rénales engendrées par le PTT sont, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort du patient (AFSSA, 2003).

#### 1.2.4. Traitements des infections à EHEC

Actuellement, il n'existe aucun traitement pour prévenir du SHU suite à une infection à EHEC. Le traitement thérapeutique du SHU repose sur le suivi des complications qu'il engendre, notamment le suivi de la fonction rénale et de la thrombocytopénie. La protection de la fonction rénale est assurée par des dialyses. Des transfusions sanguines et de plaquettes peuvent être envisagées en cas d'anémie et de thrombocytopénie (Goldwater *et al.*, 2012).

Le traitement des infections à EHEC par des antibiotiques, tels que les quinolones et la mitomycine C, est vivement déconseillé puisqu'ils augmentent le risque de développement du SHU (Smith *et al.*, 2012). Cette conséquence est due soit à la libération de toxine Stx une fois les bactéries lysées soit à l'expression et à la production de ces toxines suite à l'induction du prophage portant les gènes *stx*. L'antibiotique azithromycine n'est cependant pas impliqué dans l'expression des *stx in vitro* et a été utilisé au cours de l'épidémie due à la souche EAHEC O104:H4 de 2011 en Allemagne (Bielaszewska *et al.*, 2012). Par ailleurs, les souches EHEC O157:H7 et non-O157 présentent des résistances aux antibiotiques, comme les sulfonamides ou la tétracycline (Buvens *et al.*, 2010; Croxen *et al.*, 2013). La résistance à l'ampicilline, à la streptomycine et au triméthoprime est cependant plus fréquente chez les souches non-O157 (Buvens *et al.*, 2010; Croxen *et al.*, 2013). Les gènes de résistance aux antibiotiques sont souvent portés par des plasmides. Un plasmide ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase), rarement associé aux EHEC O157:H7, a été retrouvé chez la souche EAHEC de sérotype O104:H4 (Croxen *et al.*, 2013). Des méthodes alternatives ont été développées dans le but de créer des traitements efficaces. L'utilisation de petits peptides qui peuvent se fixer aux toxines Stx, bloquer leur adhésion aux récepteurs Gb3 ou inhiber leur transport intracellulaire a été envisagée. Les ions  $Mg^{2+}$  inhibent le transport rétrograde des Stx vers l'appareil de Golgi et se sont montrés efficaces dans un modèle de souris infectées avec la toxine Stx1 (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). L'utilisation d'un ligand, le Synsorb PK<sup>®</sup>, qui porte des récepteurs saccharidiques permettant de fixer les toxines, a été testée, mais s'est révélée inefficace puisqu'elle n'a pas réduit la sévérité de la maladie (Thomas *et al.*, 2013). Une autre stratégie implique l'utilisation d'anticorps monoclonaux. L'anticorps monoclonal Eculizumab (SOLIRIS<sup>®</sup>), dirigé contre la voie terminale d'activation du complément, s'avère être une stratégie prometteuse. Il inhibe le clivage de la protéine C5 et empêche la formation du complexe d'attaque membranaire (Lapeyraque *et al.*, 2011). Des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) des *E. coli* ont également été proposés comme thérapie puisqu'ils inhibent *in vitro* l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales humaines (Paton *et al.*, 1998). Des approches thérapeutiques incluant des microorganismes, dont les probiotiques, ont été envisagées (Cordonnier *et al.*, 2017b). Les probiotiques testés *in vitro* incluent principalement des bactéries lactiques et les levures du genre *Saccharomyces*. L'effet antagoniste des probiotiques contre les pathogènes intestinaux peut s'exercer selon trois mécanismes : (i) l'antagonisme direct dans lequel le probiotique tue le pathogène ou inhibe sa croissance, (ii) l'immuno-modulation dans lequel le probiotique interagit avec le système immunitaire de l'hôte et peut affecter la réponse immunitaire innée et/ou adaptative, et (iii) l'exclusion compétitive dans lequel le probiotique altère l'environnement intestinal pour empêcher les EHEC d'atteindre leur récepteur, d'adhérer aux cellules cibles, de traverser l'épithélium intestinal ou de perturber les fonctions de la barrière intestinale (Preidis *et al.*, 2011).

A ce jour, aucun vaccin contre les EHEC n'a encore été commercialisé. Cependant, certains sont en cours de développement grâce à l'utilisation de modèles animaux, notamment la souris et le porcelet. De nombreuses études ont utilisé soit des vaccins composés de protéines recombinantes issues de différents facteurs de virulence tels que l'intimine, Stx et EspA soit des vaccins à base d'ADN. Un vaccin contenant l'ADN non toxique de Stx2A et B s'est révélé efficace dans un modèle murin (Bentancor *et al.*, 2009).

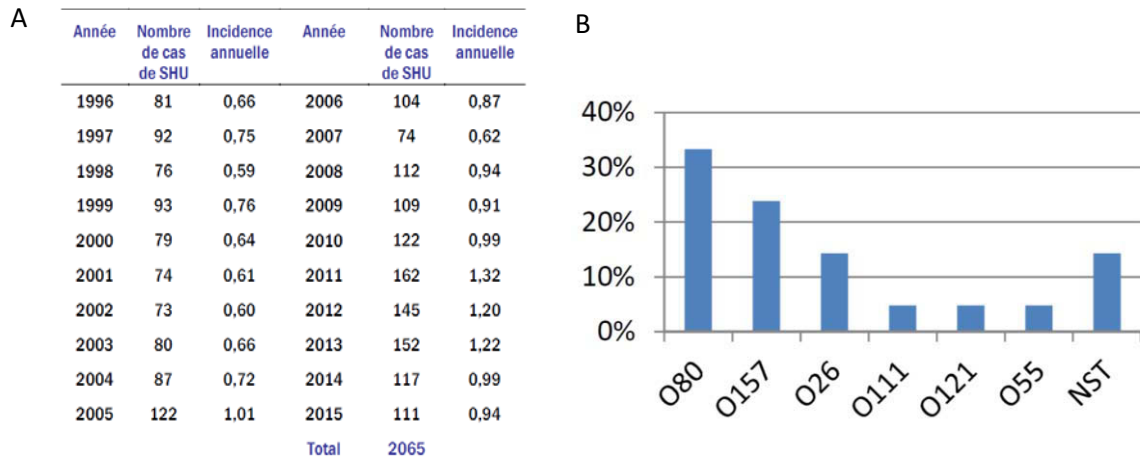
*Conclusion 1.2. : Les EHEC O157:H7 sont capables d'adhérer et de coloniser l'épithélium intestinal humain et de libérer les Shiga-toxines responsables des effets cliniques. Ces pathogènes engendrent des complications sévères, telles que le SHU qui représente la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant. De ce fait, en raison de la gravité des symptômes engendrés et de l'absence de thérapie efficace, les toxi-infections à EHEC O157:H7 représentent un problème de santé publique majeur.*

### I.3. Epidémiologie des infections à EHEC

#### I.3.1. Surveillance des infections à EHEC

La surveillance et le contrôle des infections à EHEC sont devenus des objectifs majeurs des autorités de santé publique. Bien qu'au départ ce système n'était basé que sur la détection de souches *E. coli* O157:H7, les souches de sérotypes non-O157 sont également devenues la cause de cas sporadiques et d'épidémies en Europe et aux États-Unis. Chaque pays possède un système de surveillance qui lui est propre.

En France, les infections à EHEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire et la recherche de ces bactéries dans les selles n'est pas effectuée en routine dans les laboratoires d'analyses médicales. La surveillance des infections à EHEC est basée depuis 1996 sur la surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Cette surveillance a été mise en place par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), aujourd'hui « Santé publique France », en collaboration avec des services hospitaliers. Le dernier rapport de Santé publique France a rapporté 111 cas de SHU avec une incidence de 0,94 cas par 100 000 enfants de moins de 15 ans au cours de l'année 2015 (Figure 8A) (Bruyand *et al.*, 2015). Parmi eux, 66% étaient des enfants de moins de 3 ans. Un décès a été notifié suite à un SHU. Le sérotype impliqué le plus fréquemment était O80 suivi par O157 et O26 (Figure 8B). Depuis le début de la surveillance en 1996, une recrudescence estivale du nombre de cas est observée en France mais aussi dans d'autres pays européens et en Amérique du Nord.



**Figure 8 : Surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2015** (Bruyand *et al.*, 2015). (A) Nombre de cas de SHU et incidence annuelle par 100 000 enfants de moins de 15 ans en France entre les années 1996 et 2015. (B) Sérogroupe des souches EHEC isolées dans les selles chez les enfants de moins de 15 ans atteints du SHU. NST : Non sérotypable

En Europe, le système de surveillance FWD (Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses) a été mis en place en 2007. Il est coordonné par l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) et par l'EFSA (European Food Safety Authority). En 2015, 5901 cas d'infection à STEC ont été rapportés dans 25 pays de l'UE dont 8 décès (EFSA *et al.*, 2016). L'incidence était de 1,27 cas par 100 000 habitants. Le sérogroupe le plus fréquent était O157 (41,7%) suivi par O26 et O103.

Aux États-Unis, le Centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) a établi un programme spécifique appelé « Foodborne Diseases Active Surveillance Network » (FoodNet) qui permet une surveillance active des cas de toxi-infections alimentaires dont les infections liées aux EHEC. Ce réseau a été établi en 1995 en collaboration avec l'USDA et la FDA (Food and Drug Administration) (CDC, 2016). Le dernier rapport du réseau en 2015 a signalé 465 cas dus à O157:H7 (incidence de 0,95 par 100 000 habitants) et 807 cas associés à des souches non-O157 (1,65/100 000). Comme attendu, les enfants de moins de cinq ans étaient les plus touchés par les infections liées aux EHEC (CDC, 2017).

### 1.3.2. Les épidémies majeures d'infections à EHEC

Bien que les EHEC de sérotype non-O157:H7 soient de plus en plus incriminés, c'est le sérotype O157:H7 qui est actuellement le plus fréquemment rencontré parmi les EHEC impliqués dans les épidémies et les cas de pathologies sévères aux États-Unis et en Europe. C'était également le sérotype le plus fréquent parmi les EHEC responsables de colites hémorragiques et de SHU dans les années 1980 lors de l'apparition des épidémies à EHEC.

#### 1.3.2.1. Les principales épidémies

Les EHEC ont une distribution mondiale, mais les épidémies liées à des infections à EHEC ont surtout été rapportées dans les pays industrialisés de l'hémisphère Nord et de l'hémisphère Sud. Cependant, les EHEC sont également retrouvés dans des pays en développement comme l'Argentine qui a l'incidence de SHU lié aux infections par les *E. coli* O157:H7 la plus élevée chez les enfants de moins

de 5 ans (Rivero *et al.*, 2010). Au cours des principales épidémies survenues en Europe et en Amérique du Nord, des produits carnés ou de charcuterie ont tout d'abord été mis en cause, puis plus récemment des végétaux mais aussi des produits laitiers (Farrokh *et al.*, 2013). La consommation d'eau de distribution contaminée a aussi été à l'origine d'épidémies.

Les premières épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7 ont eu lieu aux États-Unis en 1982 dans deux États distincts. Il a été recensé 47 malades et cette épidémie était liée à la consommation de viande hachée de bœuf (Riley *et al.*, 1983). En Ecosse en 1996, une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 a conduit à 512 cas pathologiques parmi lesquels 34 ont développé un SHU et 17 sont décédés. L'enquête a permis d'incriminer de la viande de bœuf et d'autres produits à base de bœuf provenant d'une même boucherie. Cette épidémie est la plus importante jamais rapportée au Royaume-Uni (Cowden *et al.*, 1997). Au Japon, dans la ville de Sakai, une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 a eu lieu en 1996. Au total, 9451 cas ont été identifiés et 12 décès ont été observés. Cette épidémie a affecté plusieurs collectivités telles que les crèches et les maisons de retraite. L'infection était liée à la consommation de germes de radis blancs contaminés et peu cuits provenant d'un seul producteur. Cependant l'origine de la contamination n'a pu être confirmée (Mermin *et al.*, 1999). En 2000, au Canada, une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 a été décrite dans une ville située en zone d'élevage intensif de bovins. Plus de 2000 cas ont été identifiés, 27 malades ont développé un SHU et 7 sont décédés. Les investigations épidémiologiques ont montré que les infections étaient liées à la consommation d'eau de distribution municipale contaminée (Anonymous, 2000). Enfin, en 2011, en Allemagne, une épidémie causée par *E. coli* O104:H4 a été décrite (Frank *et al.*, 2011). Un total de 3816 cas a été détecté parmi lesquels 845 ont développé un SHU et 54 sont décédés. En plus de l'Allemagne, des cas de colites hémorragiques et de SHU dues à *E. coli* O104:H4 ont également été retrouvés dans 15 autres pays d'Europe et en Amérique du Nord pendant la même période. En France, 24 cas ont été identifiés (92% d'adultes) parmi lesquels 7 ont développé un SHU. Des graines de fenugrec contaminées provenant d'Égypte semblent être la source de l'infection. Cette épidémie était inhabituelle puisque la majorité des personnes ayant développé un SHU était des adultes (89%).

#### 1.3.2.2. Les épidémies en France

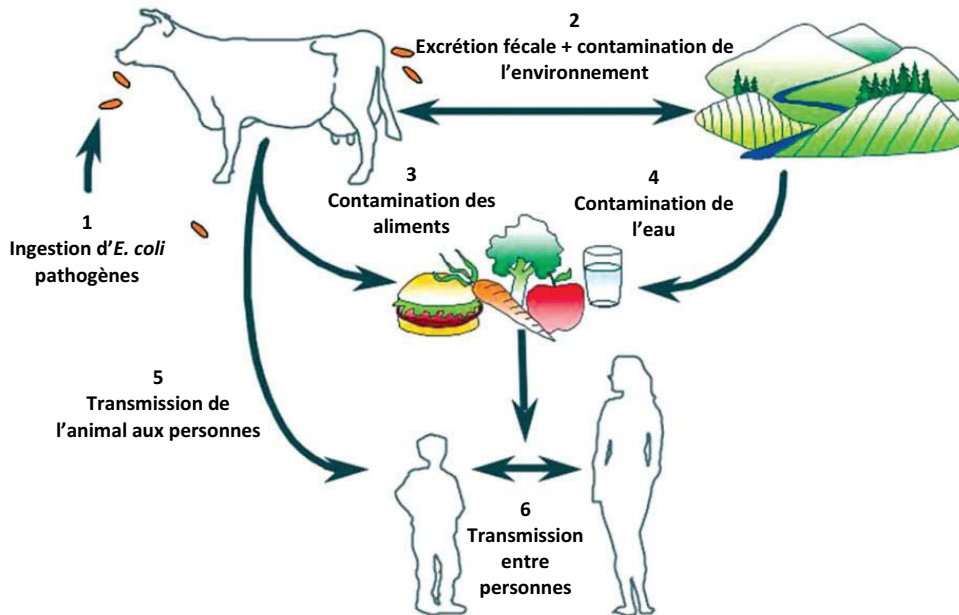
En France, la première toxi-infection alimentaire collective (TIAC) liée à *E. coli* O157 a été détectée en décembre 2000 et était due à des merguez peu cuites (AFSSA, 2003). La deuxième a eu lieu en 2002 et était liée à des EHEC de sérotype O148:H8 (AFSSA, 2003). L'origine de la contamination a été attribuée à de la viande de mouton provenant d'un élevage familial. Ensuite, l'année 2005 a été marquée par la survenue de deux épidémies d'ampleur majeure (Espie *et al.*, 2005). L'une des épidémies était due à des EHEC de sérotypes O26:H11 et O80:H2 et était liée à la consommation de camembert au lait cru. La deuxième épidémie était due à des EHEC de sérotype O157:H7 ayant contaminé de la viande hachée de bœuf surgelée. C'est la première épidémie à *E. coli* O157:H7 due à la consommation de steaks hachés de bœuf en France. Une autre épidémie survenue en juin 2011 était également liée à la consommation de viande hachée surgelée et a concerné exclusivement des enfants ; cette épidémie était due à des souches EHEC O157:H7 (King *et al.*, 2014; King *et al.*, 2011). Deux épidémies ont de nouveau eu lieu en 2012. La première, liée à la consommation de steaks hachés de bœuf, était due à des EHEC O157:H7 alors que la deuxième était due à une transmission interhumaine d'EHEC de sérotype O111 chez des enfants fréquentant la même crèche (King *et al.*, 2012). En 2013, une épidémie à EHEC O157 a été identifiée probablement en lien avec la consommation d'un fromage au lait cru (King *et al.*, 2013). A l'exception de ces années, les données



de surveillance depuis 1996 montrent que le SHU en France est majoritairement sporadique. Aucune épidémie n'a été recensée en 2014 et 2015.

### I.3.3. Sources et modes de transmission

Dans le monde, la principale source d'infection est d'origine alimentaire (Figure 9) (EFSA & ECDC, 2016). Les aliments mis en cause lors d'épidémies ont des caractéristiques communes. Ils sont susceptibles d'être contaminés par des STEC, possèdent des caractéristiques physicochimiques permettant la survie des STEC et sont consommés sans avoir été suffisamment cuits. Les aliments plus particulièrement à risque sont les denrées d'origine animale, qui sont directement liées au réservoir animal de STEC (voir chapitre II) et les produits qui peuvent être en contact direct ou indirect avec des fèces animales et consommés crus ou peu cuits (Figure 9) (Kintz *et al.*, 2017). Les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies d'infections à EHEC sont donc la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, les produits laitiers non pasteurisés, les produits végétaux crus ou non pasteurisés et l'eau de boisson. Lors d'épidémies dues à *E. coli* O157:H7, des hamburgers mal cuits, des produits transformés à base de viande de porc ou de cerf, du jus de pomme non pasteurisé, des yaourts et des fromages à base de lait cru ont été incriminés comme sources d'infection (AFSSA, 2003). Un nombre croissant d'infections a été associé à la consommation de fruits et légumes comme les graines germées, les épinards ou la laitue. La consommation d'eau de puits, de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés et d'épidémies à *E. coli* O157 (Figure 9). L'ingestion accidentelle d'eau contaminée lors de baignades (lac, étang, piscine) a elle aussi été incriminée. Toutes les sources d'infection à l'origine d'épidémies ou de cas sporadiques n'ont pu être identifiées et ont été classées comme sources inconnues. La contamination de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant été infectées, représente un mode de transmission important (Figure 9) (AFSSA, 2003). Il a été observé en milieu familial ou dans des collectivités telles que les crèches, les maisons de retraite ou les institutions médico-sociales. La transmission d'infections à *E. coli* O157:H7 à l'Homme, par contact direct avec des animaux de ferme ou domestiques ou leurs déjections, a été décrite lors d'investigations de cas isolés, d'étude de cas sporadiques et lors d'épidémies (Figure 9). Enfin, des cas de contamination de laboratoire ont également été décrits dans la littérature.



**Figure 9 : Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal**, adaptée de Fairbrother *et al.* (2006). La transmission des EHEC par l'alimentation représente la principale source d'infection pour l'Homme. La transmission entre personnes qui peut être observée en milieu familial ainsi que le contact direct entre l'Homme et les animaux de la ferme constituent également des sources d'infection.

Des recommandations concernant la prévention de la transmission des infections à EHEC et du SHU ont été publiées (ANSES, 2017b). Le respect des mesures générales d'hygiène en cuisine est primordial : lavage des mains, nettoyage des surfaces de travail et des ustensiles, séparation des aliments crus et cuits. Il est également nécessaire de bien cuire à cœur les viandes de bœuf hachées (70°C pendant deux minutes) et les produits à base de viande de bœuf consommés par les jeunes enfants et les personnes âgées. Les légumes, les fruits mais aussi les herbes aromatiques, en particulier ceux qui vont être consommés crus, doivent être soigneusement lavés et si possible épluchés avant leur préparation et leur consommation. Enfin, le lait cru et les fromages au lait cru ne doivent pas être consommés par les enfants de moins de 3 ans.

*Conclusion 1.3. : Les toxi-infections à EHEC O157:H7 surviennent majoritairement suite à la consommation d'aliments d'origine animale, notamment la viande de bœuf crue ou peu cuite, mais également par contact direct avec l'environnement de la ferme. Par conséquent, dans ce travail, nous nous sommes intéressés au portage animal des EHEC O157:H7 mais aussi à leur capacité à persister dans l'environnement de la ferme.*

## Chapitre II : Écologie animale et environnementale des STEC

### II.1. Présence des STEC chez les animaux

#### II.1.1. Les espèces réservoirs

Les souches STEC sont fréquemment isolées du tube digestif de nombreuses espèces animales d'élevage, domestiques et sauvages. Les espèces animales réservoirs sont capables de maintenir le portage en l'absence d'exposition aux STEC et constituent une source de transmission intra- et inter-espèces.

##### II.1.1.1. Les bovins

Les ruminants, notamment les bovins, sont considérés comme le principal réservoir des STEC O157:H7 et non-O157 (majoritairement O5, O26, O103, O111, O118 et O145) (Duffy *et al.*, 2014). Plus de 120 sérogroupes de STEC ont été isolés du tube digestif du bovin. En revanche, la souche *E. coli* O104:H4 responsable de l'épidémie de 2011 n'est pas portée par les bovins français (Auvray *et al.*, 2012). Dans le tractus gastro-intestinal du bovin, la présence des STEC est transitoire et le portage est asymptomatique puisque les bovins ne possèdent pas le récepteur Gb3 des Shiga-toxines à la surface des cellules endothéliales intestinales et rénales (Hoey *et al.*, 2002; Pruimboom-Brees *et al.*, 2000). Néanmoins, les STEC ont quelquefois été associés à des infections intestinales chez les veaux nouveau-nés (Kolenda *et al.*, 2015; Moxley *et al.*, 2010). La dose infectieuse conduisant à une excrétion fécale de STEC chez le veaux a été estimée à moins de 300 bactéries (Besser *et al.*, 2001). Les *E. coli* O157:H7 ont été isolés du rumen et de nombreux segments du tube digestif de bovins expérimentalement et naturellement infectés (Grauke *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2003). Ces bactéries sont néanmoins plus fréquemment retrouvées dans la partie distale de l'intestin, notamment au niveau du côlon et de la partie terminale du tube digestif appelée la jonction recto-anale (RAJ pour « recto-anal junction »). Au sein d'un même troupeau, des animaux peuvent excréter une souche STEC de façon sporadique pendant plusieurs semaines alors que d'autres restent négatifs pendant plusieurs mois. De manière générale, les périodes d'excrétion élevée sont séparées de périodes d'excrétion réduite ou de non-excrétion (Besser *et al.*, 1997). Ceci contribue fortement à la variation de la prévalence rapportée dans la littérature. Le nombre de STEC excrétés dans les fèces des animaux peut varier de  $10^2$  à  $10^6$  bactéries/g de fèces. Au Royaume-Uni, une étude à l'abattoir a rapporté que 70% des animaux porteurs excrétaient moins de 100 STEC O157/g de fèces mais que certains pouvaient excréter jusqu'à  $10^6$  bactéries/g de fèces (Omisakin *et al.*, 2003). Les animaux excrétaient des niveaux supérieurs à  $10^4$  STEC O157/g de fèces sont appelés « super-excréteurs ».

##### II.1.1.2. Les autres ruminants

Les petits ruminants, tels que les ovins et les caprins, constituent également un réservoir important de STEC O157 (La Ragione *et al.*, 2009). En Europe, en 2015, la prévalence de STEC chez les ovins et les caprins était de 18,5% et 4,3% pour les STEC O157, respectivement (EFSA & ECDC, 2016). La transmission de STEC chez ces animaux se fait majoritairement par voie oro-fécale. Comme chez les

bovins, le portage chez les petits ruminants est asymptomatique, probablement en raison de l'absence du récepteur des Shiga-toxines (La Ragione *et al.*, 2009). Les ovins constituent le premier réservoir de STEC en Australie, principalement ceux du sérotype O26 (Duffy *et al.*, 2010). Ces animaux ont également été reconnus comme réservoir de STEC O26:H11 en Norvège (Brandal *et al.*, 2012). Des études ont montré que les fèces et la viande de mouton constituaient un important réservoir de souches STEC pathogènes pour l'Homme (Duffy & McCabe, 2014). Rappelons qu'en France, plusieurs cas d'infection ces dernières années ont concerné des aliments d'origine ovine ou caprine. Le comportement social prononcé des caprins avec les humains pourrait augmenter le risque de transmission d'infections zoonotiques par voie oro-fécale (La Ragione *et al.*, 2009).

Le buffle domestique a été identifié comme un réservoir important de STEC dans de nombreux pays, comme l'Italie, le Vietnam et le Bangladesh (Galiero *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2008; Vu-Khac *et al.*, 2008). Les cervidés sont également capables d'excréter des souches STEC et représentent un réservoir potentiel (Persad *et al.*, 2014). De nombreuses infections humaines à EHEC ont été rapportées suite à la consommation de gibiers contaminés, telles que, par exemple, en 2012 dans le Minnesota, une épidémie à *E. coli* O145:NM et à O103:H2 (Rounds *et al.*, 2012). Les élans et les bisons sont considérés comme des réservoirs de STEC puisque de nombreuses épidémies à *E. coli* O157:H7 ont été associées à la consommation de viande de bison contaminée ou de fruits contaminés par des fèces d'élan (Persad & LeJeune, 2014).

#### II.1.2. Les hôtes accidentels

Certains animaux colonisés par des souches STEC sont capables de les excréter dans l'environnement et constituent ainsi une source de transmission pour les autres animaux. Cependant, sans exposition à une source de contamination de STEC, le portage n'est pas maintenu. C'est cette caractéristique qui distingue ces animaux, appelés « hôtes accidentels », des véritables réservoirs.

##### II.1.2.1. Les porcs

Les porcs peuvent être colonisés par des STEC de nombreux sérotypes, incluant le O157 (Booher *et al.*, 2002). La prévalence des *E. coli* O157:H7 chez le porc est faible, moins de 1% en Europe en 2015, tandis que celle des STEC est de 8,3% (EFSA & ECDC, 2016). Cependant, au Canada, une épidémie à *E. coli* O157:H7 a été décrite suite à la consommation de viande de porc contaminée (Trotz-Williams *et al.*, 2012). Comme chez l'Homme, des STEC de certains sérotypes peuvent être hautement pathogènes chez le porc, puisque contrairement aux ruminants, le porc possède, au niveau intestinal, le récepteur globotétrasyllcéramide (Gb4) spécifique du variant Stx2e qui est le plus fréquemment retrouvé dans les fèces de porc (Fratamico *et al.*, 2004). Des œdèmes peuvent se développer suite à la colonisation de l'intestin du porc par des souches STEC produisant la toxine Stx2e (Cornick *et al.*, 1999). En général, les STEC de sérotypes O138, O139 et O141 sont les plus impliqués dans la pathologie chez le porc mais n'ont pas été associés à des pathologies humaines (Duffy & McCabe, 2014).

### II.1.2.2. Les oiseaux

De nombreuses espèces d'oiseaux représentent un risque potentiel de dissémination et de transmission des STEC dans l'environnement, notamment au niveau des fermes et des élevages qui représentent une source de nourriture pour ces animaux (Pedersen *et al.*, 2007). De plus, le profil migrateur de certaines espèces d'oiseau ainsi que leur capacité à parcourir de longues distances favoriseraient la transmission des STEC dans l'environnement. Bien que la prévalence soit faible, les STEC ont été isolés de fèces de pigeons, de mouettes, de corbeaux et d'étourneaux. Une épidémie à *E. coli* O157 liée au contact indirect avec des fèces de corbeaux a été décrite chez de jeunes enfants (Ejidokun *et al.*, 2006). Des études ont mis en évidence la transmission de STEC portés par des oiseaux, notamment les étourneaux, aux bovins, probablement par contamination de l'alimentation ou de l'eau de boisson (Kauffman *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011). Le portage de STEC chez la volaille, notamment les dindes, a été rapporté (Doane *et al.*, 2007).

### II.1.2.3. Les animaux de compagnie

Les animaux de compagnie, notamment les chiens, sont capables d'excréter des *E. coli* O157 et non-O157. En raison de leur proximité avec les Hommes, les chiens peuvent être considérés comme des vecteurs de transmission de STEC (Hogg *et al.*, 2009). Des infections humaines ont en effet été décrites en Suède suite à des contacts directs avec ces animaux (Anonymous, 2011). Par ailleurs, une souche *E. coli* de sérotype O145:NM, hautement pathogène pour l'Homme, a été identifiée chez un chat asymptomatique en Argentine (Rumi *et al.*, 2012). Une souche STEC du même sérotype a également été retrouvée au sein d'un même foyer chez un chat et un enfant de deux ans en Allemagne (Busch *et al.*, 2007). D'autres animaux de compagnie tels que les rongeurs, les lapins et les oiseaux peuvent être considérés comme vecteurs de transmission des STEC (Persad & LeJeune, 2014).

Peu de données épidémiologiques concernant le portage des STEC chez les chevaux sont disponibles dans la littérature. Malgré une faible prévalence, des cas d'infection chez l'Homme ont été décrits suite à un contact direct avec des chevaux (Chalmers *et al.*, 1997; Persad & LeJeune, 2014).

### II.1.3. Les culs de sac épidémiologiques

Les espèces animales appelées « cul de sac épidémiologique » sont incapables de transmettre les STEC à d'autres animaux. C'est le cas des poissons et des crustacés qui peuvent être infectés lorsque leur environnement a été contaminé par les matières fécales d'un mammifère. Les crustacés constituent un risque important de transmission des STEC à l'Homme. En effet, en raison de leur mode d'alimentation, ils sont capables de concentrer et de retenir le pathogène. De nombreuses études ont rapporté la présence de souches *E. coli* O157 et non-O157 dans des poissons et des crustacés mis à la vente (Gourmelon *et al.*, 2006; Guyon *et al.*, 2000; Persad & LeJeune, 2014). L'infection chez l'Homme ne survient que lorsqu'ils sont consommés crus ou peu cuits.

*Conclusion II.1. : Les STEC O157:H7 ont été retrouvés chez de nombreux animaux domestiques et sauvages. Cependant, le tube digestif des ruminants, notamment des bovins, représente le principal réservoir naturel des STEC O157:H7. Chez les bovins, le portage est asymptomatique puisqu'ils ne possèdent pas le récepteur Gb3 reconnu par les Shiga-toxines. Ainsi, au cours de ce travail, nous avons étudié la survie de souches E. coli O157:H7 dans l'ensemble du tube digestif du bovin.*

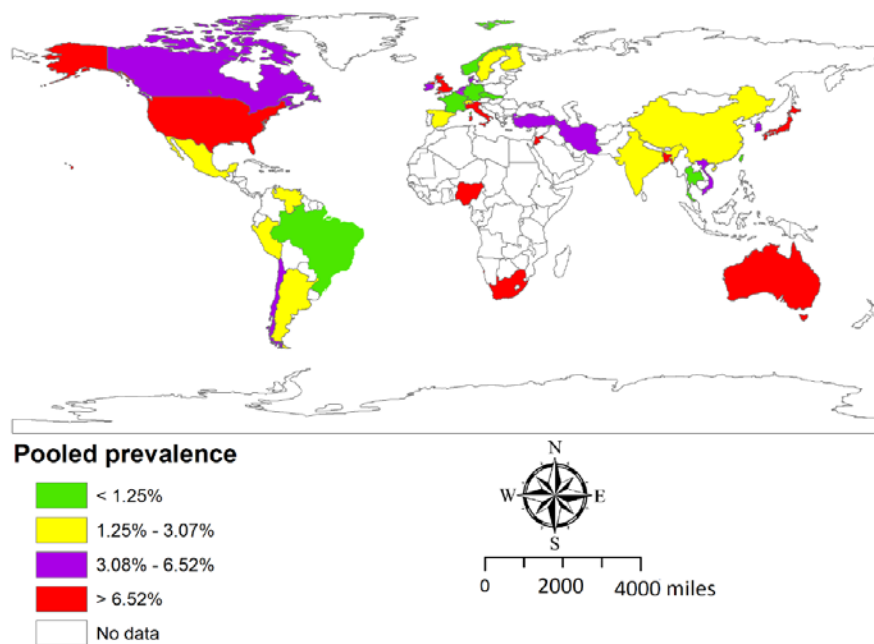
## II.2. Prévalence des STEC dans les élevages bovins

### II.2.1. Données chiffrées du portage des STEC chez les bovins

L'estimation de la prévalence des STEC, notamment des *E. coli* O157:H7, au cours des différentes étapes des filières de production de la viande, permet d'évaluer les risques liés à la dissémination des EHEC dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire de l'Homme. La détection de STEC dans les matières fécales est le seul moyen d'estimer leur prévalence chez l'animal (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2001; Elder *et al.*, 2000). Les données de la littérature concernant la prévalence des STEC dans les fèces, sur les cuirs des animaux et les carcasses sont nombreuses, alors que les données quantitatives sur le nombre de STEC présent sont rares. L'hétérogénéité de la prévalence mesurée selon les études et dans les différents pays provient probablement d'une réelle variabilité individuelle de portage de STEC selon les animaux et la période considérée. Les études épidémiologiques sont également compliquées par le fait que les méthodes d'échantillonnage et de détection (PCR des gènes *stx*, dénombrement et isolement sur milieux spécifiques, séparation immunomagnétique) sont différentes selon les études.

#### II.2.1.1. Dans les fèces

A l'échelle internationale, la prévalence des souches *E. coli* O157 dans les matières fécales bovines est estimée à 5,7% bien qu'elle puisse varier de 0,1% à 61,8% (Islam *et al.*, 2014). L'Afrique a la plus forte prévalence (31,2%) comparée aux autres régions du monde. Cependant, peu de données sont disponibles et cette prévalence ne concerne que deux pays d'Afrique, le Nigeria et l'Afrique du Sud. La plus faible prévalence a été estimée dans les pays d'Amérique Latine et dans les Caraïbes (1,7%). Des prévalences variables ont également été rapportées en Asie (4,7%), en Europe (5,2%), en Australie (6,9%) et en Amérique du Nord (7,4%). En Amérique du Nord, les États-Unis présentent la plus forte prévalence (7,6%) en comparaison avec le Mexique et le Canada. En 2015, la prévalence des STEC était de 8,3% et celle des STEC O157 de 2,5% chez les bovins en Europe (EFSA & ECDC, 2016). En Europe, la plus forte prévalence d'*E. coli* O157 a été rapportée en Italie (10,5%) et la plus faible en Norvège (0,3%) (Islam *et al.*, 2014). L'estimation de la prévalence des *E. coli* O157 dans les matières fécales bovines est représentée à l'échelle internationale sur la Figure 10.



**Figure 10 : Estimation de la prévalence d'*E. coli* O157 dans les matières fécales bovines de différents types de bovins dans différents pays** (Islam *et al.*, 2014). La prévalence a été estimée sur la base de 140 articles scientifiques concernant 220 427 bovins dans différents systèmes de production.

En France, un nombre limité de travaux a permis de quantifier le portage des STEC par le cheptel bovin français (Forano *et al.*, 2013). Le portage a été quantifié à 70% entre les années 1996 et 1997 sur des fèces de bovins à l'abattoir testés par PCR (gènes *stx*) et à 34% sur ces mêmes animaux lorsqu'il était évalué par isolement des souches (Pradel *et al.*, 2000). Parmi ces souches, seulement 0,5% appartenaient au sérotype O157:H7 suggérant que la majorité des souches STEC isolées du bovin n'était probablement pas pathogènes pour l'Homme (Pradel *et al.*, 2000). En 2003-2004, 35% des fèces des troupeaux de vaches laitières testés étaient *stx+* par PCR et le sérotype O157:H7 concernait 1,7% des prélèvements (Fremaux *et al.*, 2006; Raynaud *et al.*, 2005). Une étude réalisée en 2010-2011 a détecté que plus de 60% des échantillons de fèces prélevés chez des animaux à l'abattoir contenaient des souches STEC (détection de *stx+* par PCR) (Bibbal *et al.*, 2015). Cette même étude a rapporté des prévalences de 4,5%, 2,4%, 1,8% et 1% de STEC du top 5 chez les jeunes bovins laitiers, les jeunes bovins à viande, les vaches laitières et les vaches à viande, respectivement, alors que la prévalence des souches O157:H7 était respectivement de 2,1%, 1,4%, 1,2% et 0,8% (Bibbal *et al.*, 2015).

D'une manière générale, les quantités de STEC excrétés par les bovins dans les matières fécales sont peu rapportées dans la littérature. Une méta-analyse réalisée en 2015 a répertorié environ 40 articles qui ont estimé la prévalence des *E. coli* O157 dans les fèces de bovins en Amérique du Nord entre les années 2000 et 2013 (Ekong *et al.*, 2015). D'après cette étude, la prévalence des *E. coli* O157 dans les fèces de bovins variait de 0 à 55% alors que le pourcentage d'*E. coli* O157 détectable dans les fèces (>200 bactéries/g de fèces) variait de 1,34% à 18,56% chez les bovins (Ekong *et al.*, 2015). Au Royaume-Uni, la prévalence des STEC O157 a été évaluée à 7,5% dans les fèces bovines, et parmi les animaux naturellement contaminés, 70% excrétaient moins de 100 bactéries/g de fèces (Omisakin *et al.*, 2003). De même, en Irlande, la prévalence des STEC O157 était de 2,3% dans les matières fécales

bovines et la grande majorité des échantillons de fèces ne comptait que des quantités en bactéries en dessous de la limite de détection des méthodes de dénombrement utilisées (entre 100 à 1300 bactéries/g de fèces) (Thomas *et al.*, 2012). Les différentes méthodes de détection utilisées contribuent à la grande variabilité de la prévalence parmi les différentes études réalisées dans les différents pays.

Les STEC de sérogroupes non-O157 ont également été isolés de fèces de bovins. Aux États-Unis, la prévalence des souches *E. coli* de sérogroupes O45, O26, O103, O121, O145 et O111 était de 13,8%, 9,9%, 9,3%, 5,5%, 1,1% et 0,5%, respectivement (Dargatz *et al.*, 2013). La majorité des souches de sérogroupes non-O157 possédait les gènes *stx1* (65,5%), *stx2* (98,6%) et *eae* (69,3%). En Irlande, Thomas *et al.* (2012) ont montré que la prévalence des souches STEC de sérogroupes O26, O103, O145 et O111 parmi les STEC isolés de fèces d'animaux naturellement infectés était de 1,5%, 1%, 0,7% et 0%, respectivement (Thomas *et al.*, 2012). En Belgique, les souches STEC de sérogroupes O26, O103, O111 et O145 ont également été isolés de fèces de bovins et détectées dans 4% des échantillons de fèces collectés (Joris *et al.*, 2011). De manière générale, les souches de sérogroupes O111 et O145 sont moins fréquemment détectées dans les fèces de bovins que celles d'autres sérogroupes. De plus, pour un même sérotype, le profil des gènes de virulence est plus hétérogène parmi les souches de sérogroupes non-O157 en comparaison avec celui de souches du séro groupe O157 (Ennis *et al.*, 2012).

#### II.2.1.2. Sur les cuirs et les carcasses

Les cuirs des animaux peuvent être contaminés par des STEC O157:H7 directement via les matières fécales animales ou indirectement via le sol. La contamination des carcasses par les STEC se produit lors d'accidents d'éviscération quand du contenu intestinal ou des matières fécales animales entrent en contact avec la surface de la viande ou lorsque le cuir contaminé des animaux entre en contact avec la carcasse. Les cuirs ont été reconnus comme source principale de contamination des carcasses par les *E. coli* O157:H7 et non-O157 (Moxley *et al.*, 2014). En France, aucune donnée sur la prévalence des STEC sur les cuirs des animaux n'est disponible dans la littérature à ce jour. Cependant, une étude concernant l'année 1997 a estimé la prévalence des STEC dans les fèces de bovins et sur les carcasses correspondantes dans sept abattoirs (Rogerie *et al.*, 2001). Le portage des STEC a été quantifié à 18,1% dans les fèces et 10,7% sur les carcasses testées par PCR pour la présence des gènes *stx* ; et à 7,9% et 1,9%, respectivement, sur ces mêmes animaux lorsqu'il était évalué par isolement des souches (Rogerie *et al.*, 2001).

En Amérique du Nord, la prévalence des *E. coli* O157 sur les cuirs de bovins dans les élevages et dans les abattoirs variait respectivement de 1,5% à 98% et de 0% à 100% (Ekong *et al.*, 2015). Cependant, la quantité d'*E. coli* O157 dénombrable sur les cuirs (> 40 bactéries/100 cm<sup>2</sup> de cuir) était plus faible dans les élevages que dans les abattoirs suggérant que la contamination des cuirs survient majoritairement au cours du transport des animaux vers les abattoirs (Moxley & Acuff, 2014). En Europe, des résultats similaires ont été obtenus. La prévalence des STEC O157 sur les cuirs peut être élevée (17,6%), mais pour la majorité des animaux contaminés, les quantités d'*E. coli* O157 dénombrées sont en dessous de la limite de détection des méthodes de dénombrement (< 10 bactéries/cm<sup>2</sup> de cuirs) (O'Brien *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2012). Par ailleurs, Arthur *et al.* (2011) ont étudié la survie d'une souche *E. coli* O157:H7 sur les cuirs et ont montré que la souche n'était plus détectée au bout de 11 jours, indiquant que ces bactéries ne sont pas capables de persister



pendant de longues périodes sur les cuirs (Arthur *et al.*, 2011). Des souches *E. coli* non-O157 ont également été isolées des cuirs des animaux. Thomas *et al.* (2012) ont étudié la prévalence et la quantité de STEC O26, O103, O145 et O111 sur les cuirs (Thomas *et al.*, 2012). La prévalence a été évaluée à 0,2% pour les sérogroupes O26 et O103 et à 0% pour les sérogroupes O145 et O111 (Thomas *et al.*, 2012). La majorité des échantillons contenait des quantités d'*E. coli* inférieures à 10 bactéries/cm<sup>2</sup> de cuir.

Sur les carcasses, la prévalence des *E. coli* O157 a été estimée avant éviscération et après éviscération et interventions antimicrobiennes (Ekong *et al.*, 2015; Elder *et al.*, 2000). En Amérique du Nord, la prévalence variait de 0% à 93,3%, de 0% à 54,4% et de 0 à 5,4%, respectivement avant éviscération, après éviscération et après interventions antimicrobiennes (Ekong *et al.*, 2015). La quantité d'*E. coli* O157 dénombrable (> 0,5 bactéries/100cm<sup>2</sup>) était plus faible après éviscération et traitements antimicrobiens. Des STEC non-O157 ont également été isolés de la surface de la carcasse et ont été retrouvés dans 53,9% des échantillons avant éviscération et dans 8,3% des échantillons après éviscération et traitements antimicrobiens (Arthur *et al.*, 2002). La diminution de la prévalence et de la quantité de bactéries observées sur les carcasses a été attribuée aux bonnes pratiques d'hygiène tout le long du processus d'abattage.

De nombreux traitements chimiques et biologiques ont été développés en Amérique du Nord afin de réduire la contamination des carcasses par les STEC (Moxley & Acuff, 2014). Des produits désinfectants peuvent également être directement appliqués sur les cuirs des animaux. La diminution de la prévalence des *E. coli* O157:H7 sur les cuirs a en effet été directement corrélée à une diminution de la prévalence sur les carcasses (Arthur *et al.*, 2004). Bien que le recours à des traitements visant à réduire les contaminations des carcasses soit couramment mis en œuvre dans de nombreux pays (États-Unis, Canada, Argentine, Brésil, Australie et Nouvelle-Zélande), l'Europe a toujours montré une réticence vis à vis de ces traitements.

## II.2.2. Les facteurs de variation du portage STEC par les bovins

Les variations observées pour les taux de prévalence sont principalement liées à l'impact de facteurs environnementaux et/ou aux pratiques d'élevage. Pour expliquer cette hétérogénéité, une multitude de facteurs a été incriminée tels que des facteurs génétiques et physiologiques liés à l'animal et des facteurs liés à son environnement (Callaway *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2013). Il a été suggéré que la connaissance de ces facteurs pourrait être utilisée comme stratégie afin de diminuer la prévalence des *E. coli* O157:H7 dans les fermes et ainsi limiter la propagation de ces pathogènes dans la chaîne alimentaire de l'Homme (Matthews *et al.*, 2013).

### II.2.2.1. L'âge des animaux

De multiples travaux ont montré une association significative entre l'âge des animaux et le portage des STEC. La plupart des bovins sont exposés aux STEC au cours du sevrage (Karmali *et al.*, 2010). De manière générale, la prévalence des STEC augmente pendant les premiers mois après la naissance puis diminue et se stabilise chez le bovin adulte. Ainsi, le portage des STEC chez les veaux et les jeunes bovins est plus important que chez les bovins adultes. Il a été montré que la prévalence de STEC la plus élevée est retrouvée chez des jeunes bovins de 2 ans mais aussi chez des veaux de 6 mois (Mir *et al.*, 2016; Mir *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013). Il a été proposé que l'augmentation de la

diversité du microbiote du tractus digestif observée avec l'âge de l'animal, probablement due au changement du type d'alimentation, conduise à une diminution de la prévalence et de l'excrétion des STEC (Zhao *et al.*, 2013). Ainsi, une diversité microbienne importante pourrait inhiber la survie et la prolifération des STEC dans le tube digestif des bovins adultes. Par ailleurs, la modification du système immunitaire des animaux peut également expliquer la différence de prévalence entre les jeunes bovins et les bovins adultes. Ainsi, la présence d'anticorps maternels anti-Stx acquis au cours de la première année après la naissance confère une immunité temporaire aux animaux et empêche la colonisation de leur tube digestif par des souches STEC (Frohlich *et al.*, 2009). Ensuite, après disparition de ces anticorps, les veaux excrètent de fortes concentrations en STEC pendant plusieurs mois (Frohlich *et al.*, 2009). Par ailleurs, la différence d'excrétion observée entre les jeunes veaux et les bovins adultes peut également être due à une fonction ruminale immature chez les jeunes veaux. En effet, dans le rumen des bovins adultes, la croissance des *E. coli* O157:H7 est inhibée par la forte concentration en acides gras volatiles et par l'acidité.

#### II.2.2.2. Les saisons

La prévalence des O157:H7 chez les bovins (fèces, cuirs et carcasses) est connue pour augmenter en été et au début de l'automne et diminuer en hiver de manière similaire aux infections humaines à *E. coli* O157:H7. La prévalence des *E. coli* O157:H7 peut varier de 5% pendant l'hiver jusqu'à 80% pendant l'été (Callaway *et al.*, 2009). Cependant, au Canada, il a été démontré que la prévalence des souches de sérogroupes O111 et O145 était plus importante en hiver (Stanford *et al.*, 2016). Des résultats contradictoires ont été décrits en Ecosse ; la prévalence des STEC O157 était plus importante en hiver qu'en été, cependant, les quantités de STEC O157 excrétés par les bovins super-excréteurs étaient plus élevées en été (Ogden *et al.*, 2004). Ces données indiquent que la quantité de STEC excrétés et disséminés dans l'environnement, et non le taux de prévalence, constitue le risque le plus important de propagation des pathogènes dans la chaîne alimentaire de l'Homme.

Afin d'expliquer l'augmentation de la prévalence en été, plusieurs hypothèses ont été proposées. L'augmentation des températures pendant l'été favoriserait la survie et la prolifération des STEC dans l'environnement et augmenterait la transmission des STEC aux bovins (Lal *et al.*, 2012). Cependant, la persistance des *E. coli* O157:H7 est favorisée par des températures peu élevées. Ainsi, les basses températures peuvent expliquer le maintien de ces pathogènes dans l'environnement en hiver quand le taux d'excrétion est faible. Il a néanmoins été montré que des températures élevées pouvaient aussi favoriser la transmission des *E. coli* O157:H7 entre les animaux, notamment dans les élevages de type « feedlot » (Smith *et al.*, 2001). L'augmentation de la durée du jour pourrait engendrer des réponses physiologiques chez l'animal et influencer la recrudescence estivale de la prévalence des STEC O157:H7. En effet, il a été montré que l'ajout de 4 à 5 heures de lumière supplémentaires par jour et pendant 53 jours augmentait la prévalence de ces pathogènes (Edrington *et al.*, 2006). L'effet de certaines hormones, comme la mélatonine (hormone du sommeil) a été étudié, mais les résultats obtenus étaient contradictoires (Edrington *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2006). La thyroïde ainsi que les hormones thyroïdiennes pourraient également être impliquées dans la fluctuation saisonnière de l'excrétion de *E. coli* O157:H7 (Edrington *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2005). Néanmoins, une étude a suggéré que la contamination environnementale par des STEC O157 influençait le taux de transmission aux animaux et que la variation de l'excrétion au cours des saisons résultait plus probablement de différentes sources d'exposition aux STEC que de facteurs endocriniens (Gautam *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2015).

Enfin, l'augmentation de la prévalence des *E. coli* O157:H7 pendant l'été coïnciderait avec l'augmentation du nombre de certains insectes tels que les mouches. En effet, des souches *E. coli* O157:H7 ont été isolées chez certaines espèces de mouches collectées sur des animaux de productions laitières et bovines. Cependant, l'impact direct des mouches sur la prévalence n'a jamais été démontré (Rasmussen *et al.*, 2001).

#### II.2.2.3. Les « super-excréteurs »

La majorité des bovins excrète dans les fèces des concentrations d'*E. coli* O157:H7 en dessous du niveau de détection des techniques de dénombrement. Cependant, des concentrations de  $10^5$  à  $10^6$  bactéries/g de fèces ont été détectées (Jeon *et al.*, 2013; Omisakin *et al.*, 2003). Ces animaux, qui excrètent des concentrations supérieures à  $10^4$  *E. coli* O157:H7/g de fèces, sont appelés « super-excréteurs » (Chase-Topping *et al.*, 2008). Il a été suggéré qu'une forte excrétion d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces serait la conséquence de la colonisation persistante et de la multiplication des STEC au niveau de la jonction recto-anale alors qu'une faible excrétion résulterait d'un passage transitoire des STEC le long du tractus digestif de l'animal et/ou d'une faible colonisation (Cobbold *et al.*, 2007; Low *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2005a). Les bovins super-excréteurs constituent un risque important de transmission des STEC entre animaux au sein des troupeaux via les cuirs et l'environnement (Arthur *et al.*, 2009). Ils augmentent également le risque d'infection chez l'Homme puisqu'ils sont responsables de l'augmentation de la prévalence des O157:H7 sur les carcasses (Arthur *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2013). Les mécanismes par lesquels certains animaux (2 à 5% dans les troupeaux) deviennent super-excréteurs ne sont pas connus. Des facteurs de l'hôte, du pathogène et/ou de l'environnement seraient impliqués dans la super-excrétion (Chase-Topping *et al.*, 2008; Munns *et al.*, 2016). Les super-excréteurs ont un impact important sur l'épidémiologie des *E. coli* O157:H7 puisqu'ils sont responsables de la présence de plus de 95% des souches O157:H7 excrétées dans les troupeaux (Naylor *et al.*, 2005a). Dans les fermes, l'identification et l'isolement des animaux super-excréteurs pourraient être une stratégie envisageable afin de limiter la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez les bovins et dans leur environnement mais aussi dans la chaîne alimentaire.

#### II.2.2.4. Influence du régime alimentaire

L'effet du régime alimentaire sur le portage et l'excrétion des STEC O157:H7 a été étudié mais n'a pas été clairement établi (Callaway *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009). Il a été cependant admis que le portage de ces pathogènes était plus faible chez les troupeaux nourris au foin que ceux nourris au grain (Callaway *et al.*, 2009). Aux États-Unis, les bovins en finition sont nourris avec des rations riches en grain afin d'optimiser les performances des animaux et l'efficacité de production. Il a été montré que les bovins nourris avec une ration de type « feedlot » (riche en grain) hébergeaient 1000 fois plus de souches *E. coli* O157:H7 que des bovins nourris avec 100% de foin de bonne qualité (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998). Un régime riche en grain semble ainsi favoriser la survie des STEC dans le tube digestif de l'animal et donc l'excrétion fécale. De plus, ce régime semble induire des mécanismes de résistance à l'acidité chez les bactéries, conduisant à l'émergence de souches STEC « acido-résistantes » susceptibles de mieux coloniser ultérieurement le tube digestif d'un hôte animal ou humain (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). Cependant, différentes études menées sur des bovins nourris au foin ou au grain ont donné des résultats contradictoires. Il semble en effet que la nature de l'aliment présent dans la ration ait aussi une influence. Un régime foin distribué aux animaux en

finition a des impacts différents sur la présence d'*E. coli* selon la nature du fourrage, un fourrage de mauvaise qualité augmentant l'excrétion des *E. coli* O157:H7 (Callaway *et al.*, 2009). Par ailleurs, lors d'infections expérimentales de bovins, un régime foin a permis une meilleure survie d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces des animaux qu'un régime à base de grains ou d'ensilage de maïs (Wells *et al.*, 2014a). Enfin, d'autres études n'ont rapporté aucun effet du régime alimentaire sur le portage des STEC chez l'animal (Caprioli *et al.*, 2005). L'effet du régime alimentaire sur la prévalence des *E. coli* O157:H7 peut être attribué à une modification de l'écologie intestinale (pH et acides gras volatiles) qui est directement liée à la composition du régime alimentaire. Des études ont également montré que la structure et la composition du microbiote fécal étaient différentes entre des animaux nourris au foin et ceux nourris au grain (Wells *et al.*, 2014a). Cependant, les mécanismes par lesquels le régime alimentaire impacte l'écologie microbienne du tube digestif bovin, incluant les *E. coli* commensaux et les *E. coli* O157:H7, restent à élucider.

#### II.2.2.5. Les conditions de logement des bovins

Le type d'élevage et par conséquent les conditions de logement des bovins ont été considérés comme un facteur potentiel de variation de la prévalence (Ekong *et al.*, 2015). Une augmentation de la prévalence a été constatée lorsque les animaux sont groupés au sein d'un même enclos (Cobbold *et al.*, 2002). Au Canada, la plus forte prévalence d'*E. coli* O157:H7 a été retrouvée dans une région qui possédait la plus forte densité d'élevages de type « feedlot » (Stanford *et al.*, 2016). Smith *et al.* (2001) ont montré que les animaux élevés dans ce type d'élevage excrétaient une proportion d'O157:H7 plus élevée que les animaux élevés dans d'autres conditions (Smith *et al.*, 2001). Ce type d'élevage a été considéré comme un facteur important de dissémination et de transmission des STEC, notamment du sérotype O157:H7, entre les animaux (Smith *et al.*, 2001). Par ailleurs, de mauvaises conditions d'hygiène (accumulation de fumier) seraient associées à une excrétion accrue de STEC (Smith *et al.*, 2001).

#### II.2.2.6. Le stress

Différents stress subis par les animaux peuvent modifier l'écosystème intestinal et impacter la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez les bovins, même si les mécanismes ne sont pas encore bien connus (Rostagno, 2009). Certaines hormones de stress telles que les catécholamines ont montré *in vitro* un effet direct sur la croissance de bactéries pathogènes, dont les *E. coli* O157:H7 (Freestone *et al.*, 2007). De plus, les catécholamines favorisaient l'adhésion et la formation des lésions A/E des *E. coli* O157:H7 à la muqueuse intestinale de l'iléon dans un modèle d'infection *in vitro* (Vlisidou *et al.*, 2004). Les sources de stress des animaux sont principalement dues aux mauvaises pratiques de conduite d'élevage, à une carence nutritive ou au transport. Le transport des animaux jusqu'à l'abattoir, ainsi que les conditions de stockage en étable d'attente rendent les animaux plus susceptibles à l'infection et à la colonisation par les *E. coli* O157:H7, et augmentent ainsi l'excrétion fécale de ce pathogène (Berry *et al.*, 2010). La mise à jeun des bovins avant l'abattage augmente le nombre d'*E. coli* tout au long du tractus digestif et en particulier celui des *E. coli* O157:H7 dans le rumen (Callaway *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 1993). Par ailleurs, ces animaux présentent également une augmentation des entérobactéries et des bactéries anaérobies dans leur tube digestif, suggérant que le stress des animaux pourrait avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal (Gregory *et al.*, 2000). Enfin, le stress du sevrage peut également influencer la

prévalence puisqu'il a été montré que la prévalence et la concentration des STEC excrétés dans les fèces d'animaux ayant déjà vêlés étaient plus importantes que celles des génisses (Mir *et al.*, 2015; Venegas-Vargas *et al.*, 2016).

#### II.2.2.7. Le microbiote intestinal

Certains facteurs comme l'âge, le régime alimentaire et le stress des animaux influencent la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez les bovins probablement en impactant la composition et la structure du microbiote intestinal. Par conséquent, le microbiote intestinal affecterait la colonisation et l'excrétion des souches O157:H7 par les bovins. De plus, le microbiote intestinal des animaux super-excréteurs diffère de celui des non super-excréteurs, suggérant que la composition du microbiote à un rôle important dans l'établissement des *E. coli* O157:H7 le long du tractus digestif de l'animal (Xu *et al.*, 2014; Zaheer *et al.*, 2017). La variation du microbiote intestinal entre les troupeaux mais aussi entre les animaux issus d'un même élevage permet difficilement de déterminer si un groupe de bactéries peut affecter le portage des *E. coli* O157:H7 tout le long du tube digestif de l'animal ainsi que l'excrétion dans les matières fécales. Les interactions entre les souches *E. coli* O157:H7 et le microbiote endogène sont décrits dans le Chapitre III.

*Conclusion II.2. : La prévalence des O157:H7 chez les bovins varie considérablement en fonction des différentes études mais également en fonction de nombreux paramètres environnementaux et de l'hôte. Le portage chez les jeunes bovins est plus important que chez les bovins adultes et le microbiote intestinal peut impacter la colonisation et l'excrétion de ces pathogènes. Dans ce travail de thèse, un modèle animal a été développé pour comprendre et maîtriser le portage des EHEC O157:H7. Des jeunes bovins ont été utilisés et une attention particulière a été attribuée au microbiote intestinal de ces animaux.*

## II.3. Écologie des STEC dans l'environnement

### II.3.1. Les sources de transmission aux bovins

La transmission des STEC chez les bovins se fait par voie oro-fécale lorsque les animaux sont en contact avec les fèces contaminées d'autres animaux ou avec les effluents qui en dérivent (fumier et lisier). La présence régulière de STEC O157 et non-O157 dans les fèces des animaux est principalement responsable de la persistance et de la survie de ces pathogènes dans l'environnement et par conséquent de l'infection ou de la réinfection d'autres animaux (Duffy, 2003; Duffy & McCabe, 2014; Faith *et al.*, 1996; Maule, 2000). Par ailleurs, la contamination fécale des sols, des enclos et des cuirs favoriserait la transmission des STEC entre les animaux et a été considérée comme source de transmission plus probable que la ration alimentaire ou l'eau de boisson (Cobbold & Desmarchelier, 2002).

## II.3.1.1. Survie et persistance des STEC dans les matières fécales animales

Les fèces des bovins constituent une des sources principales de contamination de l'environnement et de transmission entre les animaux. L'étude de la persistance des STEC dans des fèces expérimentalement contaminées a été réalisée dans un nombre limité d'études en fonction de conditions expérimentales variées. Dans ces études, la quantité de STECensemencée expérimentalement dans les matières fécales animales tient compte des données de la littérature concernant le taux d'excrétion chez les animaux naturellement infectés ( $10^2$  à  $10^6$  bactéries/g de fèces) (Omisakin *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 1995).

Dans des fèces bovines artificiellement inoculées à  $10^5$  bactéries/g de fèces à partir d'un mélange de 5 souches d'*E. coli* O157:H7 et conservées dans des sacs stériles ouverts, les bactéries étaient capables de survivre pendant 70 jours à 5°C et ont conservé leur capacité à produire les Shiga-toxines (Wang *et al.*, 1996). Bien que la persistance soit plus faible à des températures plus élevées, ces pathogènes étaient capables de survivre jusqu'à 56 jours et 49 jours à 22°C et 37°C, respectivement (Wang *et al.*, 1996). Lorsque les fèces étaient contaminées avec  $10^3$  bactéries/g de fèces et stockées dans les mêmes conditions, la persistance des souches O157:H7 restait élevée (63 jours à 5°C, 49 jours à 22°C et 42 jours à 37°C) (Wang *et al.*, 1996). Dans ces conditions, et quelle que soit la concentration en STEC de l'inoculum de départ, les *E. coli* O157:H7 étaient incapables de se multiplier à une température de 5°C, alors qu'une croissance était observée à 22°C et 37°C (Wang *et al.*, 1996). De manière générale, plus la concentration en bactéries inoculées est élevée au départ, plus les souches sont capables de persister pendant de longues périodes, particulièrement à des faibles températures. L'activité de l'eau ( $a_w$ ) aurait une influence sur la survie des bactéries à 22°C et 37°C. A ces températures, l' $a_w$  diminue au cours du temps alors qu'elle reste proche de 1 à 5°C. Par ailleurs, le régime alimentaire des bovins semblerait également avoir une influence sur la survie des STEC dans les matières fécales excrétées dans l'environnement (Wells *et al.*, 2005). Il a été montré qu'une forte teneur en acides phénoliques, composés communs aux fourrages, diminuait significativement le taux de cellules viables d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces de bovins (Wells *et al.*, 2005). Une autre étude réalisée à partir de fèces bovines inoculées avec  $7 \times 10^7$  bactéries/g de fèces a montré que la souche *E. coli* O157:H7 était encore présente à  $3,8 \times 10^6$  bactéries/g de fèces après 54 jours de stockage à 18°C (Maule, 2000). La survie de souches STEC O157:H7 dans des fèces bovines a également été étudiée en fonction du type de support (sac stérile ou parcelle de sol herbeux) dans l'environnement (Bolton *et al.*, 1999). Les résultats ont indiqué que la souche O157:H7 survivait plus longtemps sur la parcelle de sol herbeux. En plus du sérotype O157, les STEC de sérotypes O26 étaient capables de persister pendant 126 jours à 15°C et pendant 112 jours pour les STEC de sérotype O111 dans les mêmes conditions (Fukushima *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces données indique que les STEC O157:H7 et non-O157 excrétés dans les matières fécales animales sont capables de survivre et de persister pendant de longues périodes dans les fèces de bovins, même à faible dose. Ainsi, les fèces semblent constituer un environnement favorable pour la survie des STEC et constituent une source importante de contamination de l'environnement. Ces déjections émises dans les exploitations étant récupérées sous la forme de lisier ou de fumier, il est important de définir les conditions de survie des STEC dans ces effluents.

## II.3.1.2. Survie et persistance des STEC dans les effluents d'origine bovine

La contamination des effluents d'origine bovine participe à la dissémination environnementale et au maintien des STEC dans les troupeaux de bovins. Cette dissémination survient à travers l'épandage d'effluents d'élevage et par l'élimination des effluents et boues de stations d'épuration d'abattoirs. Dans les élevages, les effluents solides sont représentés par le fumier qui consiste en un mélange de matières fécales animales, d'urine et de paille. Les effluents liquides comprennent le lisier, un mélange d'urine, d'excréments et d'eau, et le purin (jus s'écoulant du fumier). Dans les abattoirs, les effluents peuvent provenir du lisier produit par les animaux pendant l'attente de l'abattage, des eaux issues du nettoyage des animaux et des eaux usées générées par le personnel de l'abattoir (lavage et désinfection des mains, du matériel et des locaux). De nombreux travaux ont étudié la survie et la persistance des STEC dans les effluents d'élevage. Dans le fumier et le lisier, la persistance et la survie des STEC peuvent être influencées par différents facteurs comme (i) les caractéristiques chimiques des effluents (pH, humidité et composition), (ii) les interactions microbiennes (antagonisme, compétition et prédation) et (iii) les paramètres physiques (température, radiations UV et pluies). En France, une étude a montré que 11% des effluents de troupeaux laitiers étaient contaminés par des STEC (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). De manière générale, la persistance des STEC dans les effluents d'origine animale semble être favorisée par des températures inférieures à 5°C, dans des conditions d'anaérobiose et lorsque les animaux ont reçu une alimentation riche en grains (Kudva *et al.*, 1998; McGee *et al.*, 2001). D'autre part, Semenov *et al.* (2011) ont étudié l'influence des conditions d'oxygénation sur la survie des *E. coli* O157:H7 dans les fumiers et les lisiers à 16°C et ont montré que les bactéries survivaient significativement plus longtemps en condition anaérobie (6 mois) qu'en condition aérobie (2 semaines). Les conditions d'oxygénation ont probablement affecté la communauté microbienne et la composition chimique des fumiers et lisiers, influençant ainsi la survie des *E. coli* O157:H7. La survie des souches à de faibles températures serait probablement liée à l'inhibition du métabolisme des bactéries du microbiote endogène (Kudva *et al.*, 1998). De nombreuses études ont montré que les *E. coli* de sérotype O157:H7 et non-O157, notamment O26:H11, étaient capables de survivre dans les fumiers et les lisiers jusqu'à 90 jours à des températures inférieures à 15°C (Avery *et al.*, 2005; Fremaux *et al.*, 2007a; Fremaux *et al.*, 2007b; McGee *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2005). Les températures élevées semblent au contraire être associées à l'inactivation des pathogènes.

En raison de la survie des STEC O157 et non-O157 pendant de longues périodes dans les effluents d'origine animale, la gestion des déchets animaux est essentielle afin de limiter le risque de dissémination de ces pathogènes dans l'environnement. Des pratiques de gestion des déchets animaux, tels que les traitements biologiques (digestion aérobie et anaérobie par des microorganismes), semblent être une bonne approche pour désinfecter les effluents. D'une part, ces traitements constituent une stratégie écologique réduisant significativement le nombre de STEC, et d'autre part, ils sont facilement applicables dans les élevages (Fremaux *et al.*, 2008). Le compostage est un moyen efficace de gérer les déchets solides des animaux. Il est fréquemment réalisé puisqu'il permet de transformer des composés organiques en amendement des sols ou engrais organiques et de libérer une quantité importante d'eau, de CO<sub>2</sub> et d'ammonium. Dans des conditions contrôlées d'aération, d'humidité et d'apport en carbone et en azote, le compostage peut atteindre une température de 55 à 65°C qui pourrait être suffisante à l'inactivation des STEC (Duffy & McCabe, 2014). L'augmentation de la température au cours du processus de compostage est majoritairement

due à l'activité de fermentation des bactéries du microbiote endogène (champignons, bactéries et protozoaires).

En conclusion, les STEC possèdent une importante capacité à survivre dans les effluents, prérequis indispensable à leur dissémination dans l'environnement immédiat de la ferme.

#### II.3.1.3. Survie et persistance des STEC sur et dans les sols

Les sols, de par leur composition, forment un milieu extrêmement favorable au développement de microorganismes. Le sol peut être directement contaminé par les fèces d'animaux ou par les effluents d'origine animale, notamment lors des fortes précipitations (Martinez-Vaz *et al.*, 2014). Il apparaît que les STEC O157:H7 ont la capacité de survivre et de persister dans les sols pendant plusieurs mois. Une étude a montré que les *E. coli* O157:H7 étaient capables de survivre pendant plus de 200 jours dans les sols sur lesquels avait été dispersé du compost contaminé (Franz *et al.*, 2011). De nombreux facteurs peuvent affecter la survie et la prolifération des STEC dans le sol, tels que le pH, la texture du sol, sa composition en eau, le climat, les interactions microbiennes et le type de souche bactérienne (Franz *et al.*, 2011; Martinez-Vaz *et al.*, 2014). Ces facteurs sont responsables de la grande variabilité de persistance des *E. coli* dans les sols (Maule, 2000).

#### II.3.1.4. Survie et persistance des STEC dans les eaux et l'alimentation du bétail

L'eau de boisson des animaux peut jouer un rôle important lors de la dissémination horizontale du pathogène dans les troupeaux de bovins (Bach *et al.*, 2002). Les STEC O157:H7 ont été isolés des abreuvoirs des animaux et sont capables de persister et de survivre pendant de longues périodes (de quelques jours à plusieurs mois). Les abreuvoirs constituent des sources majeures de contamination et recontamination des bovins, notamment par la salive qui jouerait le rôle de vecteur de contamination (Faith *et al.*, 1996; Van Donkersgoed *et al.*, 2001). Les bovins au pâturage peuvent également directement contaminer les cours d'eau (Ferens & Hovde, 2011). De plus, les STEC O157:H7 pourraient survivre facilement dans les systèmes de distribution d'eau potable. Il a été supposé que dans un milieu pauvre en nutriments, tel que l'eau, la survie des pathogènes était favorisée grâce à la formation de biofilms (Chekabab *et al.*, 2013).

La ration alimentaire des animaux constitue un autre site de prolifération des STEC O157:H7, favorisant ainsi la dissémination de ces pathogènes dans l'environnement de la ferme (Bach *et al.*, 2002) et la contamination des bovins (Hancock *et al.*, 2001). Plusieurs études ont en effet montré la présence des *E. coli* O157:H7 dans des échantillons de ration collectés dans les mangeoires (Van Donkersgoed *et al.*, 2001). Des nuisibles tels que des oiseaux ou des rongeurs pourraient être une source de contamination de l'aliment dans la ferme (Medhanie *et al.*, 2014). Les ensilages peuvent également être contaminés par des *E. coli* pathogènes via les effluents et l'eau d'irrigation. Néanmoins, il a été montré que les *E. coli* de sérotype O26 ne sont pas capables de survivre au cours du processus d'ensilage de maïs (Dunière *et al.*, 2011).

#### II.3.2. Les végétaux

En raison de l'augmentation d'épidémies humaines associées à la consommation de fruits et légumes contaminés par des EHEC, la survie et la persistance de ces bactéries ainsi que les mécanismes



moléculaires par lesquels elles interagissent avec les végétaux ont été largement étudiés. Les végétaux sont majoritairement contaminés par l'eau d'irrigation ou par les sols traités par des effluents d'origine animale contaminés par les STEC. De plus, la transformation des déchets animaux (fumier et lisier) en amendement des sols ou engrais organiques favoriserait la contamination des cultures par les STEC. Les STEC sont capables de survivre de longues périodes sur une large variété de fruits et légumes mais aussi sur de nombreuses herbes aromatiques (Ferens *et al.*, 2011). Il a également été montré que l'eau contaminée appliquée à la surface des végétaux lors de l'arrosage pouvait conduire à l'internalisation des *E. coli* O157:H7 via des sites de blessure (Martinez-Vaz *et al.*, 2014). L'internalisation du pathogène dans les tissus le rend inaccessible aux désinfectants et le protège des interactions potentielles avec les flores compétitives ou antagonistes mais également de la prédation par les protozoaires. Ceci accroît par conséquent la survie des bactéries au sein de la plante et pose un véritable problème dans la maîtrise du risque associé à la présence d'*E. coli* O157:H7 dans les végétaux. L'aptitude des *E. coli* O157:H7 à adhérer à la surface de nombreuses plantes a été étudiée. Ces pathogènes ont été isolés aussi bien au niveau des racines qu'à la surface des feuilles. La capacité des STEC à survivre et à proliférer dépend de la nature des végétaux et des conditions environnementales. Ainsi, le type de sol, l'humidité et la proximité d'une source d'eau peuvent augmenter la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez les végétaux. Bien que les facteurs permettant l'attachement des STEC aux cellules végétales n'ont pas clairement été identifiés chez les STEC, la plupart incluent des facteurs d'adhésions, de virulence, de mobilité et de formation de biofilms (Kyle *et al.*, 2010; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009b). La colonisation initiale des végétaux par les STEC débute par une étape d'adhésion impliquant des structures de surface comme les fimbriae, les curli, les flagelles et l'AST3 ainsi que des protéines impliquées dans la formation de biofilms (Martinez-Vaz *et al.*, 2014; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009b). La formation de biofilms à la surface des végétaux a été montrée dans des conditions de laboratoire mimant l'environnement. Cependant, leur implication dans la colonisation des végétaux dans un environnement naturel reste à démontrer (Martinez-Vaz *et al.*, 2014). Enfin, la colonisation et la persistance de STEC à la surface des végétaux nécessitent l'induction de réponses au stress leur permettant de résister à différents stress environnementaux (Kyle *et al.*, 2010).

### II.3.3. La résistance des EHEC dans l'environnement

Dans l'environnement, les *E. coli* O157:H7 sont confrontés aux fluctuations environnementales et leur survie dépend majoritairement de la disponibilité en nutriments, incluant les sources de carbone, d'azote et de phosphate, et de leur capacité à résister à de multiples stress. Ces stress jouent un rôle crucial puisqu'ils permettent la sélection et la survie de souches *E. coli* O157:H7 résistantes aux conditions hostiles de l'environnement (Vidovic *et al.*, 2016). De plus, les souches *E. coli* O157:H7 d'origine bovine semblent plus résistantes au stress que les souches cliniques humaines, une caractéristique qui faciliterait la colonisation du tube digestif animal par ces souches (Parker *et al.*, 2012; Vanaja *et al.*, 2010). La résistance aux stress thermique, acide, osmotique, oxydatif ou aux carences nutritionnelles, sont les principales réponses physiologiques des *E. coli* O157:H7 permettant leur survie dans le tube digestif du bovin et dans l'environnement.

## II.3.3.1. Les différents types de stress

Le ralentissement brutal de la croissance, à l'entrée des bactéries en phase stationnaire, suite à une carence nutritionnelle ou à différents stress, est associé à une modulation globale du profil d'expression génique, conférant aux cellules une forte résistance à de multiples stress et améliorant ainsi leur survie dans des conditions défavorables. Chez *E. coli*, l'acteur majeur de la réponse au stress est un facteur  $\sigma$  de l'ARN polymérase, produit du gène *rpoS* et appelé  $\sigma^S$  (Battesti *et al.*, 2011). Grâce à un ensemble complexe de régulations aux niveaux transcriptionnel et traductionnel et grâce à la stabilité de la protéine,  $\sigma^S$  s'accumule dans les cellules et active la transcription d'une série de gènes permettant l'adaptation et la survie des *E. coli* confrontés à de multiples stress.

De nombreux stress induisent le système RpoS mais certaines réponses sont redondantes avec ce dernier. C'est le cas de la petite molécule (p)ppGpp (guanosine pentaphosphate) qui est le principal effecteur en réponse à la carence nutritionnelle. Son accumulation dans la cellule déclenche l'inhibition de la synthèse d'ARN, l'arrêt de la croissance et l'activation de gènes nécessaires à la survie des bactéries dans un milieu carencé. Lors d'une carence en nutriments, la taille des cellules bactériennes diminue, augmentant ainsi le ratio surface/volume permettant une assimilation efficace des nutriments peu disponibles. Les bactéries sont également capables de produire des systèmes de transport leur permettant d'assimiler plus efficacement les nutriments disponibles. Par ailleurs, en réponse à une carence nutritionnelle, le gène *tnaA*, codant la tryptophanase, est activé. Cette enzyme permet la synthèse de pyruvate et d'indole avec libération d'ammonium à partir du tryptophane. L'indole, une molécule impliquée dans le quorum sensing, permet aux *E. coli* de s'adapter aux environnements pauvres en nutriments (Martino *et al.*, 2003). La production d'indole va en effet activer des gènes qui codent pour des enzymes permettant la dégradation d'acides aminés en pyruvate ou en succinate pour produire de l'énergie (Laverty *et al.*, 2014). Une fois excrété dans le milieu extérieur, l'indole agirait comme une molécule signal afin de préparer les autres bactéries à survivre dans un environnement carencé.

La réponse des bactéries au stress acide est complexe et fait intervenir de nombreux régulateurs dépendants du système RpoS, incluant les gènes *gad* et *hde*. Le pH est le principal senseur qui permet aux bactéries de déclencher leurs systèmes de résistance au stress acide. Les *E. coli* O157:H7 sont plus acido-tolérants que les souches *E. coli* commensales puisque ces pathogènes possèdent des systèmes de résistance supplémentaires (King *et al.*, 2010). Les principaux systèmes de résistance au stress acide ont été décrits dans le chapitre I.

La réponse des *E. coli* au stress oxydatif est également dépendante du facteur RpoS. Le stress oxydatif imposé aux *E. coli* au cours des processus de désinfection des fruits et légumes avant leur distribution aux grandes surfaces entraîne des perturbations des processus membranaires et la mort cellulaire. En réponse aux agents oxydants tels que la chlorure, les *E. coli* O157 mettent en place de nombreuses stratégies de défense telles que la détoxification cellulaire (Wang *et al.*, 2009). Généralement, les *E. coli* possèdent deux systèmes de résistance au stress oxydatif : (i) un système de réponse au stress peroxyde dont la protéine OxyR et KatE sont les principaux régulateurs transcriptionnels et (ii) un système de réponse au stress superoxyde dans lequel deux activateurs transcriptionnels majeurs, SoxR et SoxS, sont impliqués.

Les bactéries peuvent être confrontées à de forts stress osmotiques, causés par exemple par la dessiccation. Afin de maintenir une pression osmotique stable de part et d'autre des membranes bactériennes, les bactéries accumulent des concentrations très élevées de composés organiques appelés osmoprotecteurs. Par ailleurs, les *E. coli* peuvent également être confrontés aux fluctuations

de la température extérieure. Les réponses aux stress osmotique et thermique font intervenir des gènes communs dépendants de RpoS. C'est le cas des gènes *otsA* et *otsB* nécessaires à la synthèse de tréhalose qui va jouer le rôle d'osmoprotecteur. Ainsi, le tréhalose va protéger les protéines de la dénaturation dans des conditions d'hyperosmolarité et de chocs thermiques (Battesti *et al.*, 2011). L'exposition des *E. coli* O157 à des températures élevées engendre également l'induction de protéines chaperonnes incluant GroEL et son cofacteur GroES, les protéines DnaK et DnaJ, la protéine de choc thermique Hsp31 et des protéines ribosomiques (Vidovic *et al.*, 2012). Quand les températures diminuent, les membranes bactériennes se rigidifient, compromettant ainsi le taux de diffusion cellulaire et la synthèse protéique et provoquant une inhibition de la croissance bactérienne. En réponse à une diminution des températures, les protéines Csp pour « Cold Shock Protein » sont synthétisées. Le régulateur RpoS joue un rôle important dans l'adaptation des *E. coli* O157:H7 au cours d'un stress froid en augmentant et en maintenant la fluidité membranaire (Vidovic *et al.*, 2011).

### II.3.3.2. Les systèmes toxine/antitoxine

Les systèmes toxine/antitoxine (TA) constituent des éléments de réponse au stress. Ces systèmes sont localisés sur des plasmides ou sur des éléments génétiques mobiles tels que les phages ou les transposons mais aussi dans le chromosome bactérien. Les systèmes TA sont composés d'une toxine stable qui va engendrer un arrêt de la croissance en ciblant essentiellement les fonctions de transcription ou de traduction cellulaire et d'une antitoxine instable qui fixe, inhibe et dégrade la toxine. Dans des conditions de stress, l'antitoxine est dégradée et la toxine libérée. Chez les *E. coli*, dont les *E. coli* pathogènes, 36 systèmes TA ont été rapportés et classés en six catégories en fonction du mécanisme d'action de l'antitoxine sur la toxine (Page *et al.*, 2016). Plusieurs fonctions des systèmes TA ont été décrites.

Les systèmes TA peuvent engendrer une modulation de la croissance bactérienne. Lors de la carence en acides aminés, une inhibition de la croissance, et non une diminution de la viabilité, a été observée. Cette inhibition serait induite par les systèmes RelBE chez *E. coli* (Page & Peti, 2016). Une autre fonction des systèmes TA, la persistance, pourrait permettre aux bactéries de survivre en condition de stress. Les bactéries entrent dans un état de dormance leur permettant de résister à différents stress et de survivre de longues périodes en absence de nutriments. Les cellules bactériennes en dormance constituent une sous-population de bactéries hautement tolérantes aux antibiotiques et à de multiples stress (Lewis, 2010; Magnuson, 2007). Ces cellules, appelées « persisteurs », sont vivantes mais démontrent une activité métabolique faible (Lewis, 2010; Page & Peti, 2016). Ce phénomène est réversible lorsque les conditions redeviennent favorables. Les systèmes HipAB et GhoST semblent clairement impliqués dans le phénomène de persistance chez *E. coli* (Cheng *et al.*, 2014; Page & Peti, 2016). Enfin, des systèmes TA sont également responsables de la mort cellulaire programmée d'une partie de la population bactérienne (plus ou moins 90%) au profit du reste de la population. Ce phénomène se produit lors de conditions délétères incluant la carence en acides aminés, des traitements aux antibiotiques, une haute température, un choc oxydatif, une exposition aux UV ou une infection par des bactériophages (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006; Engelberg-Kulka *et al.*, 2004). Dans le cas d'une carence nutritionnelle, ce mécanisme de lyse programmée permettrait le relargage du contenu cellulaire qui pourra être utilisé comme nutriments essentiels au maintien et à la survie du reste de la population bactérienne (Bishop *et al.*, 1998).

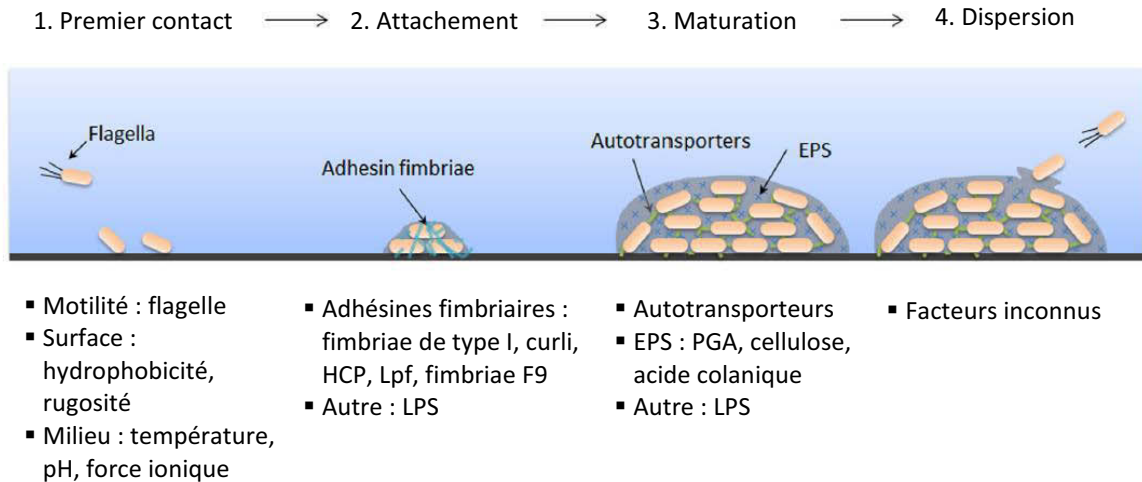
## II.3.3.3. Capacité des EHEC à adhérer et à former des biofilms

La survie et la persistance des STEC dans l'environnement peuvent être favorisées par la formation de biofilm (Vogeleer *et al.*, 2015). Les biofilms sont constitués d'agrégats de microorganismes (bactéries, champignons, protozoaires et algues) qui les protègent de contraintes environnementales incluant la dessiccation, les bactériophages ou les biocides utilisés dans les procédés industriels. Bien que la formation de biofilms soit souche dépendante, la majorité des souches *E. coli*, dont ceux de sérotype O157:H7, sont capables de former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques telles que l'acier inoxydable, le verre et le polystyrène (Picozzi *et al.*, 2016). La capacité des STEC à former des biofilms sur ces différentes surfaces est responsable de la transmission et de la persistance des STEC dans les industries de transformation de la viande (Giaouris *et al.*, 2014). Parmi l'ensemble des gènes exprimés au cours de la formation du biofilm, certains sont régulés par le facteur RpoS (Battesti *et al.*, 2011).

La formation d'un biofilm est un processus complexe qui est généralement décrit en 4 étapes (Figure 11) (Beloin *et al.*, 2008; Vogeleer *et al.*, 2014). La première étape consiste en un attachement réversible des bactéries à une surface qui nécessite des facteurs bactériens tels que les flagelles et dépend des conditions environnementales incluant le pH, la température et le type de surface. La deuxième étape nécessite la présence d'adhésines fimbriaires comme le fimbriae de type I, le curli, le pilus HCP, le Lpf et le fimbriae F9 permettant un attachement irréversible des *E. coli*. Au cours de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries s'agglutinent, se multiplient et produisent une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'acides nucléiques conduisant à la formation d'une structure tridimensionnelle complexe. À cette étape, des facteurs importants ont été identifiés chez les *E. coli* : les autotransporteurs du système de sécrétion de type V, le plasmide pO157, le LPS et les curli ainsi que les EPS tels que le polyglucosamine (PGA), l'acide colanique et la cellulose (Beloin *et al.*, 2008; Puttamreddy *et al.*, 2010). La dernière étape consiste en un détachement et une dispersion des cellules bactériennes responsables de la fragilité du biofilm. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement et la dispersion des cellules bactériennes n'ont pas été étudiés chez les STEC. C'est un processus complexe qui implique plusieurs signaux environnementaux et qui joue un rôle important dans (i) la transmission des bactéries d'un réservoir environnemental à un hôte animal ou humain, (ii) la transmission entre les hôtes et (iii) dans la propagation de l'infection chez un hôte (Tremblay *et al.*, 2014). Parmi les différentes études transcriptomiques menées, l'induction de réponses au stress au cours de la formation du biofilm est une caractéristique commune aux *E. coli* (Wood, 2009). Par ailleurs, au cours des différentes étapes de formation du biofilm, la densité bactérienne fluctue faisant intervenir des molécules du quorum sensing telles que l'auto-inducteur 2 (AI-2). L'indole semble également intervenir dans la formation du biofilm mais les résultats concernant cette molécule sont contradictoires. En effet, selon les conditions expérimentales utilisées, notamment le type de milieu de culture, l'indole peut activer ou réprimer la formation de biofilms (Domka *et al.*, 2007; Domka *et al.*, 2006; Martino *et al.*, 2003; Vogeleer *et al.*, 2014). Enfin, les catécholamines sont également impliquées dans la formation de biofilm (Bansal *et al.*, 2007).

Très peu d'informations sont disponibles concernant la formation de biofilms dans l'intestin des mammifères. En effet, le temps de transit du contenu digestif et du renouvellement de la couche de mucus intestinal est court comparé au temps nécessaire à la formation d'un biofilm stable. Cependant, la couche de mucus intestinal possède des caractéristiques similaires à la matrice extracellulaire formée dans le biofilm. La formation de biofilms a été montrée dans le mucus

intestinal du côlon de nombreux mammifères (Macfarlane *et al.*, 2011). De plus, Munns *et al.* (2015) ont proposé que les *E. coli* O157:H7 seraient capables de former des biofilms au niveau de la jonction recto-anale chez le bovin et que le processus de dispersion des bactéries serait responsable du phénotype intermittent de l'excrétion et de la super-excrétion des *E. coli* O157:H7 (Munns *et al.*, 2015).



**Figure 11 : Représentation schématique de la formation de biofilms et des facteurs associés chez une souche STEC**, adaptée de Vogelee *et al.* (2014). La formation de biofilm s'effectue en 4 étapes : (i) l'adhésion initiale des bactéries, (ii) l'attachement irréversible, (iii) la maturation du biofilm et (iv) la dispersion et le détachement des cellules bactériennes. Les facteurs connus pour jouer un rôle dans la formation du biofilm sont listés en dessous de chaque étape.

*Conclusion II.3. : Les EHEC sont capables de survivre de longues périodes dans l'environnement de la ferme (fèces, effluents, sol, eau, végétaux) augmentant ainsi le risque de contamination et recontamination des animaux et de transmission à l'Homme. Cette persistance dans l'environnement dépend de la capacité des bactéries à résister à de nombreux stress environnementaux et à former des biofilms. Nous avons ainsi étudié la capacité de souches STEC/EHEC O157:H7 à survivre dans des fèces bovines dans des conditions mimant l'environnement afin de mettre en évidence les systèmes de résistance au stress activés par les souches pour survivre en dehors du tube digestif de l'animal. Une attention a également été portée sur sa capacité à former des biofilms dans les mêmes conditions.*

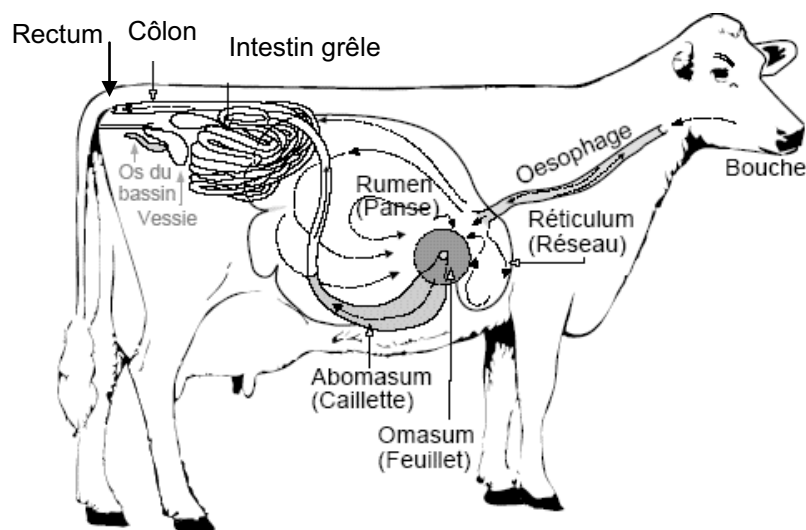


## Chapitre III : Écologie et physiologie des EHEC dans le tube digestif du bovin

### III.1. Colonisation du tube digestif bovin

#### III.1.1. Le tractus gastro-intestinal des bovins

Le tube digestif des bovins est caractérisé par la présence de trois pré-estomacs non-sécrétoires (successivement le réseau, le rumen et le feuillet) en amont d'un estomac sécrétoire (la caillette) comparable à l'estomac des monogastriques (Figure 12).

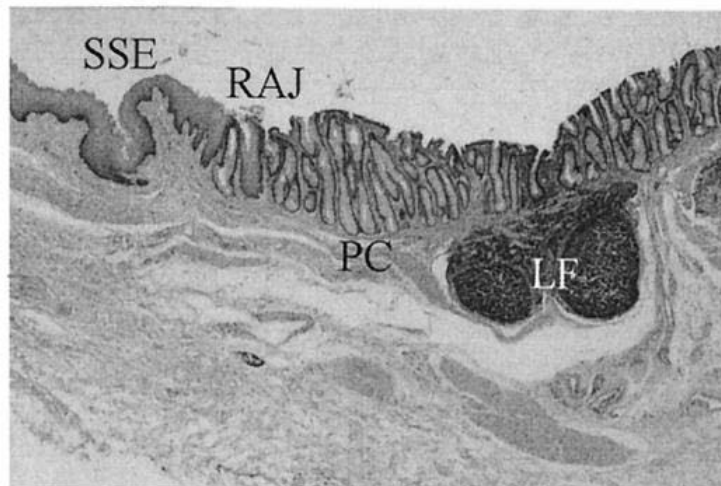


**Figure 12 : Représentation schématique du tractus gastro-intestinal du bovin**, adaptée de (Vdsciences).

Le sens du transit du digesta est signalé par des flèches.

Le rumen est le compartiment le plus volumineux et représente 60 à 70% du volume du tube digestif. Il peut atteindre 150 litres chez les bovins adultes et permet ainsi le stockage d'une grande quantité d'aliments ingérés par l'animal tout au long de la journée. Le réticulum est largement ouvert sur le rumen et sert de tamis en empêchant le passage des grosses particules vers l'omasum. Les particules indigestibles séjournent entre 25 et 60 heures dans le rumen et ne seront évacuées que lorsque leur taille atteindra quelques millimètres. Leur réduction en particules fines est assurée au cours des ruminations méryciques grâce à leur remastication et leur brassage régulier. Durant leur séjour, les polymères végétaux sont dégradés et fermentés par une communauté complexe de microorganismes symbiotiques qui assurent leur conversion en monomères puis en acides gras volatiles (AGV) rapidement absorbés par la muqueuse ruminale. Les AGV ainsi produits par l'activité des microorganismes ruminiaux fournissent 70 à 75% de l'énergie métabolisable au ruminant. Cette activité fermentaire s'accompagne de la production de plus de 1000 litres de gaz par jour comprenant 65% de  $\text{CO}_2$ , 27% de  $\text{CH}_4$ , 7% de  $\text{N}_2$  et moins de 1% de  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_2\text{S}$ . Le contenu du rumen s'organise ainsi en trois phases : (i) une phase liquide en partie ventrale contenant des particules fines et imbibées en suspension, (ii) une phase gazeuse en partie dorsale régulièrement vidangée par éructation et (iii) une phase intermédiaire solide dans laquelle les particules les plus

grosses s'accumulent. Les particules les plus petites sont évacuées vers le feuillet dans lequel les fermentations seront en partie poursuivies et où les AGV ayant échappé à l'absorption dans le rumen et une partie de l'eau et des sels minéraux seront absorbés. La digestion des aliments se poursuit dans la caillette grâce aux enzymes digestives de l'hôte et aux sécrétions acides. Les microorganismes ruminants qui transitent avec les aliments résiduels vont eux-mêmes être digérés dans la caillette et les segments postérieurs du tube digestif, fournissant ainsi à l'animal hôte près de 80% de ses sources azotées. Les digesta sont ensuite dirigés vers l'intestin comprenant l'intestin grêle, le caecum et le côlon (Figure 12). La digestion y est poursuivie et l'eau et les nutriments disponibles sont absorbés. Comme le rumen, le côlon et le caecum sont le siège de fermentation microbienne. Cependant, chez les ruminants, le rôle des microorganismes intestinaux est considéré comme mineur étant donné que le rumen assure 80 à 90% des capacités fermentaires du tube digestif. La jonction recto-anale bovine (RAJ) est localisée au niveau de la partie terminale du tube digestif entre le côlon descendant et le début du rectum (Figure 13). La RAJ est caractérisée par la jonction entre deux types d'épithélium : un épithélium prismatique associé aux follicules lymphoïdes, proche du côlon distal, et un épithélium squameux stratifié proche du canal anal (Kudva *et al.*, 2011).



**Figure 13 : Coupe histologique de la jonction recto-anale (RAJ) bovine** (Naylor *et al.*, 2003). La RAJ est définie par un épithélium squameux stratifié (SSE) et un épithélium prismatique représenté par des pseudo-cryptes (PC). Les follicules lymphoïdes (LF) sont également représentés.

### III.1.2. Localisation des STEC dans le tractus gastro-intestinal du bovin

Une fois ingérés, les STEC pénètrent dans le rumen et doivent résister à l'acidité de ce compartiment digestif. Le système de type glutamate décarboxylase (Gad) permet une bonne tolérance à l'acidité nécessaire pour le passage et la survie des STEC dans le rumen et tout le long du tube digestif de l'animal (Kudva *et al.*, 2014; Price *et al.*, 2004). Les STEC O157:H7 et non-O157 sont capables de survivre dans du contenu de rumen *in vitro* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006; de Vaux *et al.*, 2002; Free *et al.*, 2012). Cependant, ce compartiment digestif ne semble pas être un site de prolifération et de colonisation des STEC qui transitent rapidement vers l'intestin grêle, le caecum puis le côlon qui constituent des environnements plus favorables à la croissance bactérienne (Grauke *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2003). La persistance des STEC chez les bovins est due à leur capacité à coloniser des sites spécifiques du tube digestif de l'animal. Les STEC O157:H7 sont



bien adaptés à l'environnement intestinal des bovins puisqu'ils sont retrouvés tout le long du tractus digestif de l'animal : dans les contenus intestinaux et associés aux muqueuses intestinales, dans la cavité buccale, les amygdales et le foie (Keen *et al.*, 2010). La distribution des STEC O157:H7 le long du tube digestif du bovin est néanmoins très variable entre les animaux (Keen *et al.*, 2010). Toutefois, plusieurs auteurs ont rapporté que la RAJ de bovins expérimentalement et naturellement inoculés constituait le principal site de colonisation et de multiplication des STEC O157:H7 et non-O157. Cette colonisation est principalement observée au niveau de l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes mais aussi au niveau de l'épithélium squameux stratifié de la RAJ (Grauke *et al.*, 2002; Kudva & Dean-Nystrom, 2011; Lim *et al.*, 2007a; Low *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2003). Les segments digestifs inférieurs tels que l'intestin grêle, le caecum, la valvule iléo-caecale et le côlon constituent des sites mineurs de colonisation et de multiplication (Naylor *et al.*, 2003). Des études *in vitro* ont montré que les *E. coli* O157:H7 étaient capables de survivre dans des contenus de rumen, d'intestin grêle, de caecum et de rectum mais à des niveaux différents, suggérant que les facteurs et processus impliqués dans l'adhésion et la colonisation sont différents le long du tube digestif bovin (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006).

### III.1.3. Facteurs d'adhésion et de colonisation

Les interactions entre les STEC et le tube digestif de l'animal sont complexes et font intervenir de multiples facteurs d'adhésion et de colonisation et de nombreux processus cellulaires (Etcheverria *et al.*, 2013). Ces facteurs, ainsi que leur rôle dans la colonisation de l'animal sont encore mal connus.

Les lésions A/E, témoignant de l'adhésion intime des STEC à l'épithélium intestinal, ont été observées au niveau de la RAJ d'animaux expérimentalement et naturellement inoculés par une souche STEC O157:H7 (Naylor *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 2005b). La formation de ces lésions chez les bovins implique, comme chez l'Homme, la translocation du récepteur Tir dans la cellule cible et son interaction avec l'intimine (Cornick *et al.*, 2002; Dean-Nystrom *et al.*, 1998; Vlisidou *et al.*, 2006). L'intimine  $\gamma$  est requise pour une colonisation efficace des STEC O157:H7 au niveau de l'épithélium de la RAJ (Sheng *et al.*, 2006b). Les lésions A/E ont également été observées au niveau de l'épithélium de l'iléon et du côlon de bovins infectés par une souche STEC O157:H7 (Baehler *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2000). L'intimine et son récepteur Tir sont codés par des gènes portés par le LEE qui joue un rôle essentiel dans le portage des STEC dans le tractus gastro-intestinal des bovins (Stevens & Frankel, 2014). Plus particulièrement, il a été montré que l'opéron *LEE4*, codant les protéines EspABD nécessaires à la translocation de Tir dans la cellule épithéliale cible, était nécessaire à la colonisation de souches STEC O157:H7 au niveau de la RAJ de bovins expérimentalement et naturellement inoculés (Naylor *et al.*, 2005b). Ainsi, l'AST3 de ces pathogènes est essentiel à l'adhésion et à la colonisation intestinale chez le bovin (Dziva *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2005b; Sharma *et al.*, 2012; van Diemen *et al.*, 2005). Cependant, les mécanismes d'adhésion et de colonisation des STEC au niveau des deux épithélia qui caractérisent la RAJ ne sont pas identiques. Le LEE est indispensable pour coloniser l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes alors que des facteurs autres que ceux codés par le LEE, non identifiés à ce jour, semblent impliqués dans l'adhésion à l'épithélium squameux stratifié (Kudva *et al.*, 2012; Kudva *et al.*, 2013; Naylor *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 2005b).

Le flagelle H7 des souches O157:H7 permettrait l'adhésion de ces souches à l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes de la RAJ, contrairement aux flagelles H6, H11 et H21 (Mahajan *et al.*, 2009). Il faciliterait l'interaction des STEC O157:H7 à l'épithélium intestinal bovin au niveau du rectum et favoriserait l'initiation du processus de colonisation. Après l'adhésion initiale via le flagelle H7, l'expression de ce dernier diminue alors que celle des protéines codées par le LEE augmente. Ces dernières constitueraient des facteurs d'adhésion intime et de colonisation majeurs nécessaires à la persistance des O157:H7 dans le tube digestif du bovin (Mahajan *et al.*, 2009). Par ailleurs, le flagelle H7 étant immunogène, ce « switch » permettrait aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Des adhésines fimbriaires semblent également avoir un rôle potentiel dans l'adhésion à distance et la colonisation de l'intestin bovin par les bactéries (Kudva *et al.*, 2012). Parmi celles-ci, le fimbriae F9 est capable d'adhérer aux cellules épithéliales rectales bovines *in vitro* suggérant que ce fimbriae pourrait participer à la colonisation des souches STEC au niveau de la RAJ (Low *et al.*, 2006). Le pilus HCP permet à la bactérie d'adhérer aux cellules épithéliales bovines et aux protéines de la matrice extracellulaire *in vitro* (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007). Le fimbriae Lpf possède également des propriétés d'adhésion chez les animaux (Torres *et al.*, 2004). Cependant, le fimbriae de type I ne semble pas impliqué dans la colonisation par des STEC O157:H7 alors qu'il pourrait favoriser la colonisation du tube digestif bovin par les STEC de sérotypes O26 et O118 (Roe *et al.*, 2001).

Parmi les adhésines non fimbriaires, l'autotransporteur EhaA, présent à la surface des STEC O157:H7 et non-O157, permet l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales rectales bovines *in vitro* (Wells *et al.*, 2008). Le système d'acquisition du fer Iha ne semble pas être directement impliqué dans la persistance de STEC chez les ruminants (Tarr *et al.*, 2000). Le facteur d'adhésion Efa1, présent à la surface des souches STEC non-O157 et absent chez les STEC O157:H7, semble influencer l'adhésion et la colonisation de ces souches dans le tube digestif du bovin en modulant le système immunitaire de l'hôte et/ou en favorisant l'expression et la sécrétion des protéines EspA et Tir (Stevens *et al.*, 2002). Les souches STEC O157:H7 ne possèdent pas le gène *efa1* mais l'homologue *toxB* et une version tronquée du gène *efa1*, tous deux portés par le plasmide pO157. Ces gènes, *toxB* et *efa1* tronqué, permettent l'expression et la sécrétion de protéines transportées par l'AST3 mais ne semblent pas impliqués dans la colonisation intestinale chez le veau (Stevens *et al.*, 2004). Le plasmide pO157 est cependant nécessaire à l'adhésion des souches STEC et à leur colonisation du tube digestif de bovins expérimentalement inoculés (Lim *et al.*, 2007b; Sheng *et al.*, 2006b). L'autotransporteur EspP, porté par le plasmide pO157, participe à l'adhésion des STEC O157:H7 aux cellules épithéliales bovines du rectum *in vitro* et à la colonisation intestinale d'animaux expérimentalement inoculés (Dziva *et al.*, 2007).

Le gène codant l'entérohémolysine EhxA, également porté par le pO157, n'est pas impliqué dans la colonisation de l'intestin par des souches O157:H7 mais semble influencer celle des STEC O26 (Sheng *et al.*, 2006b; van Diemen *et al.*, 2005). Enfin, en dépit de la détection de toxines Stx biologiquement actives dans les fèces de bovins, leur rôle dans le portage animal des STEC est inconnu (Dean-Nystrom *et al.*, 1998). Il est cependant probable que les toxines Stx soient impliquées dans la survie des souches STEC dans le tube digestif de l'animal en induisant l'expression de chimiokines et en modulant la réponse immunitaire. Les toxines Stx peuvent en effet affecter la fonction des lymphocytes et empêcher la libération de médiateurs de l'inflammation (Smith *et al.*, 2002).

La présence de facteurs tels que le flagelle H7, le fimbriae de type I, Iha et le plasmide pO157, ayant un rôle potentiel dans l'adhésion des *E. coli* O157:H7, est variable selon le sérotype des STEC, suggérant que les STEC non-O157 utilisent des mécanismes d'adhésion et de colonisation différents dans l'intestin des mammifères (Caceres *et al.*, 2017).

### III.1.4. Les signes cliniques

Les bovins adultes sont considérés comme porteurs sains des STEC/EHEC et ne montrent donc généralement aucun signe clinique d'infection (Smith *et al.*, 2002). Chez les jeunes veaux, âgés de 2 semaines à 2 mois, certaines souches STEC ont été associées à des diarrhées (Dean-Nystrom *et al.*, 1998). Ces souches, majoritairement des STEC de sérogroupes O5, O26, O111 et O118, ont également été isolées de cas cliniques humains (Mainil *et al.*, 2005). La majorité de ces souches (> 85%) possède uniquement la toxine Stx1 et quand la toxine Stx2 est présente, il s'agit du variant Stx2c. De plus, 80% de ces souches possèdent également les gènes *eae*, *tir* et *esp*. Les *E. coli* O157:H7 ont rarement été associés à des diarrhées chez les jeunes veaux excepté chez des veaux nouveau-nés ou sevrés après une période de jeûne (Dean-Nystrom *et al.*, 1998; Moxley & Smith, 2010). Au cours de ces pathologies, la présence d'autres pathogènes entériques qui peuvent augmenter la sévérité des signes cliniques a été détectée (Moxley & Smith, 2010). La diarrhée observée chez les jeunes veaux est en fait la conséquence de la formation des lésions A/E et non de la production de Stx (Dean-Nystrom *et al.*, 1998; Mainil & Daube, 2005). La distribution des récepteurs Gb3 au niveau du tube digestif animal et son absence au niveau des cellules glomérulaires du rein ne permet ni l'apparition de signes pathologiques ni le développement du SHU (Hoey *et al.*, 2002; Pruimboom-Brees *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002).

*Conclusion III.1. : Les STEC O157:H7 ont été retrouvés tout le long du tube digestif de l'animal et semblent bien adaptés à ce biotope. La jonction recto-anale a été identifiée comme principal site de colonisation et de multiplication des souches O157:H7. De nombreux facteurs d'adhésion semblent être impliqués. Dans ce travail de thèse, la présence de l'information génétique codant des facteurs de virulence chez une souche STEC O157:H7 persistante dans l'environnement d'une exploitation agricole a été recherchée. Ceci nous permettra de mieux appréhender le caractère pathogène de cette souche. L'analyse du génome d'une souche *E. coli* commensale bovine a également été réalisée et comparée à celle d'autres souches *E. coli* dont des O157:H7.*

## III.2. Le métabolisme des EHEC O157:H7 dans l'intestin du bovin

L'intestin des mammifères est un écosystème complexe composé d'une forte diversité bactérienne qui de manière générale doit disposer de sources de carbone, d'azote et d'énergie pour se maintenir. Bien que de nombreux facteurs contribuent à la colonisation de l'intestin du bovin par les EHEC O157:H7, la compétition nutritionnelle avec le microbiote intestinal et la pénétration de la couche de mucus recouvrant les entérocytes sont primordiales à la survie de ces pathogènes. Selon la théorie de Freter, chaque espèce bactérienne du tube digestif doit utiliser un ou quelques nutriments plus efficacement que les autres espèces afin de pouvoir se maintenir dans cet écosystème très complexe (Freter *et al.*, 1983).

### III.2.1. Les sources exogènes de nutriments

Les sources exogènes de nutriments sont majoritairement apportées par la ration alimentaire de l'animal. Les glucides, essentiellement sous la forme de polysaccharides, représentent 60 à 70% de la

ration alimentaire du bovin et sont majoritairement issus des cellules végétales. D'une manière générale, les sources de carbone préférées des souches *E. coli* sont les sucres simples, en particulier le glucose. Les principaux polysaccharides de la ration alimentaire sont la cellulose et l'amidon, des polymères de glucose, mais aussi les hémicelluloses, composées d'hétéropolymères incluant le glucose, l'arabinose, le xylose, le mannose, le galactose ou le fucose. Ces polysaccharides sont dégradés dans le rumen par le microbiote endogène et les monosaccharides libérés sont très rapidement fermentés. Les sucres simples tels que le glucose ne sont retrouvés qu'à une très faible concentration dans le rumen (McSweeney *et al.*, 2012). Une faible proportion de polysaccharides peut cependant transiter jusqu'à l'intestin grêle et atteindre le côlon où ils seront dégradés en monosaccharides par les bactéries fibrolytiques de ce compartiment. Les *E. coli* ne possèdent pas l'équipement enzymatique permettant de dégrader les polymères des parois végétales (cellulose, hémicelluloses, pectines). Au niveau de l'intestin grêle, les monosaccharides sont généralement absorbés par les cellules intestinales et sont retrouvés en faible concentration (0,35 mM de glucose ont été détectés dans des contenus d'intestin grêle de bovin (Bertin *et al.*, 2013a)). Ainsi, les monosaccharides d'origine alimentaire dans l'intestin du bovin sont très peu disponibles pour les EHEC. Ces derniers devront alors trouver des sources endogènes de nutriments.

### III.2.2. Les sources endogènes de nutriments

Dans le tube digestif des mammifères, les nutriments proviennent de produits déversés par l'animal dans son tube digestif. Le renouvellement naturel de la paroi intestinale de l'animal ainsi que des microorganismes constituant le microbiote s'accompagnent de la mort et de la lyse de ces cellules dont le contenu est déversé dans la lumière intestinale et utilisé comme nutriments par les microorganismes.

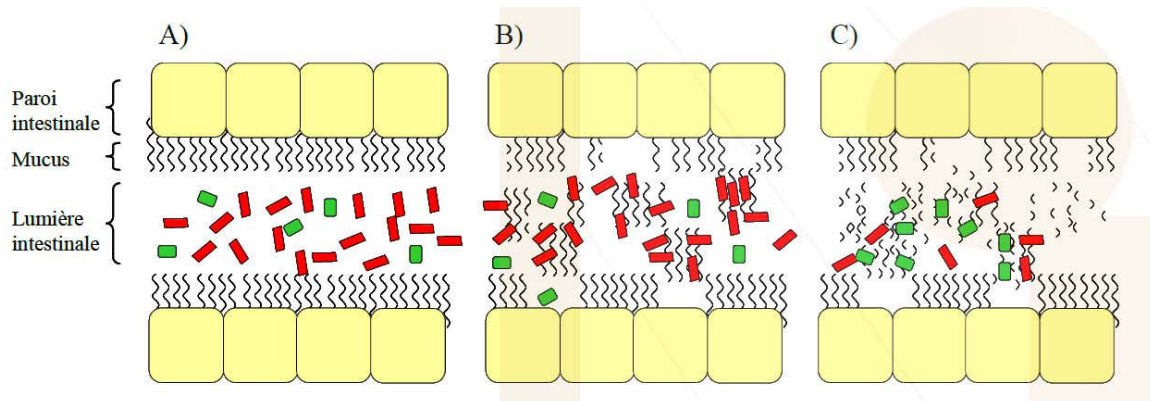
#### III.2.2.1. Les sources de carbone dans le tube digestif bovin

Les *E. coli* utilisent préférentiellement les glucides via les voies glycolytiques (voies de la glycolyse et d'Entner Dodouroff) comme source de carbone. L'assimilation des glucides est nécessaire à l'initiation de la colonisation dans le tube digestif de la souris traitée à la streptomycine (Miranda *et al.*, 2004). Une fois ces sources de nutriments épuisées, les substrats de la néoglucogenèse sont requis pour le maintien de la colonisation des EHEC O157:H7 (Bertin *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2004).

##### III.2.2.1.1. Le mucus intestinal

La couche de mucus recouvrant la paroi intestinale représente une source de carbone alternative pour les microorganismes du tube digestif des mammifères. Le mucus est synthétisé et sécrété par les cellules de Goblet et forme un réseau tridimensionnel tapissant la paroi intestinale. Il est composé de mucines (des glycoprotéines), de glycolipides, de débris cellulaires et d'électrolytes. Cette couche de mucus a pour principale fonction de lubrifier et de protéger l'épithélium intestinal des dommages causés par le bol alimentaire, les sécrétions digestives et les microorganismes, dont les pathogènes (Deplancke *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2011). Le mucus constitue également une barrière sélective pour l'absorption des nutriments au travers de l'intestin grêle. Les mucines intestinales sont les

principaux constituants du mucus et consistent en des glycoprotéines filamenteuses associées à des sous-unités de haut poids moléculaire riches en oligosaccharides et liées aux résidus sérine et thréonine (Johansson *et al.*, 2011). Le renouvellement constant de l'épithélium intestinal est essentiel au maintien de l'homéostasie de l'intestin et entraîne le déversement quotidien de 25% de cellules intestinales et de structures qui les recouvrent dans la lumière intestinale (Bertin *et al.*, 2013b). Les oligosaccharides constituant la couche de mucus sont ainsi libérés dans le tractus digestif. Les bactéries anaérobies du microbiote intestinal du ruminant sont capables d'hydrolyser ces oligosaccharides et de libérer les sucres simples dans la lumière intestinale (Figure 14). Le mucus intestinal constitue ainsi une source de nutriments constamment renouvelée et facilement accessible aux bactéries du tube digestif, dont les *E. coli* qui en retour créent un environnement anaérobie en piégeant l'oxygène nécessaire à leur multiplication.



**Figure 14 : Utilisation des oligosaccharides composant le mucus intestinal par les bactéries** (Bertin & Forano, 2013b). **A)** Les bactéries du microbiote intestinal (rouge) et les EHEC (vert) transitent dans l'intestin grêle du bovin ; **B)** Lors du renouvellement cellulaire, les chaînes de polymères de sucres composant la couche de mucus sont déversées dans la lumière intestinale ; **C)** De nombreuses bactéries endogènes peuvent hydrolyser les polymères et libérer les sucres simples qui constitueront ensuite une source de carbone pour les souches EHEC.

La composition du mucus de l'iléon du bovin a été étudiée et s'est révélée proche de celle d'autres espèces animales (porc, lapin, rat) et de l'Homme (Montagne *et al.*, 2000). Il est composé de 53% de protéines et de 47% d'oligosaccharides. Les principaux monosaccharides constituant la fraction glucidique du mucus sont le galactose (42,1%), le N-acétylglucosamine (GlcNAc) (24,1%), le N-acétylgalactosamine (GalNAc) (23,6%), le fucose (4,7%), le mannose (3,1%) et l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) (2,4%). Les acides aminés majeurs constituant le mucus iléal sont le glutamate (13,2%), l'aspartate (11,2%), la thréonine (9,6%) et la sérine (9,2%). Plusieurs études ont montré que les *E. coli* commensaux étaient capables de survivre dans la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal et de cataboliser les sucres présents qui représentent d'importantes sources de carbone (Chang *et al.*, 2004; Conway *et al.*, 2004). Les EHEC O157:H7 sont également capables de survivre dans le mucus intestinal, mais aussi de coloniser les cellules épithéliales, suggérant que ces pathogènes peuvent également utiliser des nutriments disponibles exclusivement à la surface de l'épithélium (Aperce *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2004).

Dans l'intestin grêle du bovin, ces six sucres ont été retrouvés à une concentration totale de 4,2 mM (Bertin *et al.*, 2013a). Les EHEC O157:H7 sont capables d'assimiler rapidement et simultanément l'ensemble de ces sucres (Bertin *et al.*, 2013a). De plus, chacun des six sucres est consommé plus rapidement par la souche EHEC O157:H7 EDL933 que par les bactéries du microbiote intestinal y compris les *E. coli* commensaux (Bertin *et al.*, 2013a). Ceci met en évidence une affinité importante

des souches EHEC pour les sucres du mucus et une grande efficacité à les assimiler. Cependant, en milieu synthétique, la même souche EHEC O157:H7 est capable d'assimiler neuf sucres connus du mucus intestinal de souris, mais de manière séquentielle, indiquant que l'environnement intestinal affecte la nutrition des EHEC, probablement en raison de la présence d'autres facteurs présents dans l'intestin (Fabich *et al.*, 2008).

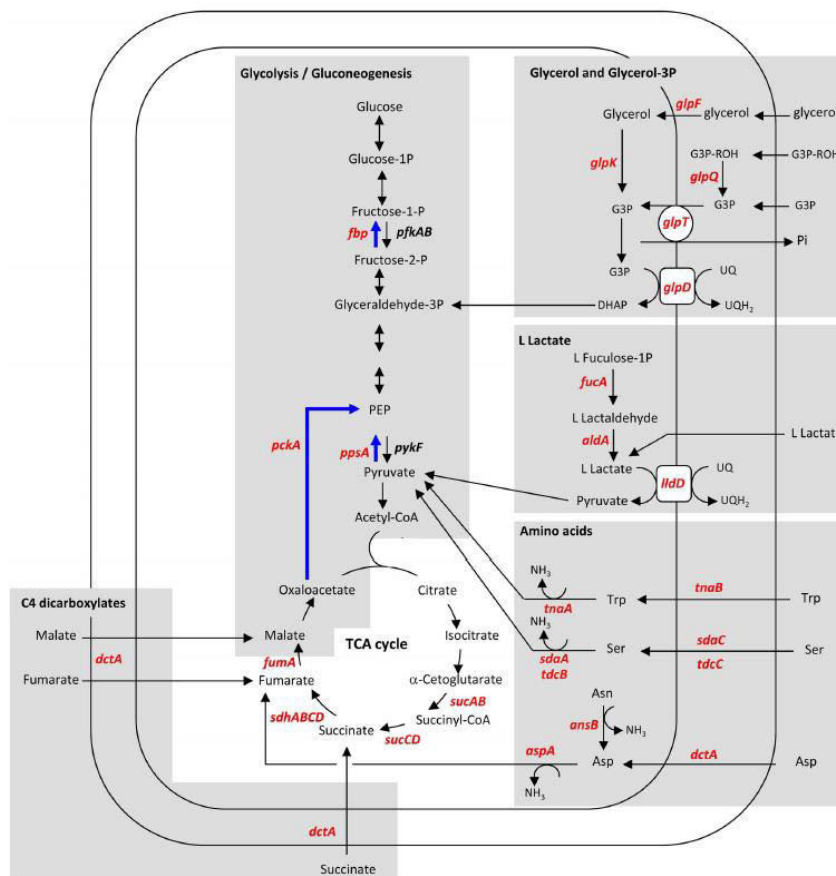
Seuls cinq des six sucres provenant du mucus intestinal bovin (le mannose, le GlcNAc, le Neu5Ac, le galactose et le fructose) confèrent un avantage de croissance aux EHEC O157:H7 EDL933 dans des contenus d'intestin grêle du bovin (Bertin *et al.*, 2013a). Le fucose représente également une source importante de carbone nécessaire à la persistance des EHEC O157:H7 au niveau du rectum du bovin (Snider *et al.*, 2009). Toutefois, le GalNAc ne semble impliqué ni dans la colonisation de l'intestin grêle bovin ni dans l'initiation et le maintien de la colonisation des souches O157:H7 au niveau du rectum du bovin (Bertin *et al.*, 2013a; Snider *et al.*, 2009). Chez la souris, six sucres issus du mucus sont impliqués dans l'initiation et le maintien de la colonisation des EHEC O157:H7 dans le tube digestif (l'arabinose, le fucose, le galactose, le mannose, le GlcNAc et le ribose) (Fabich *et al.*, 2008). Le Neu5Ac n'est pas impliqué dans la colonisation du tube digestif murin alors que ce sucre confère un avantage de croissance important dans l'intestin du bovin (Bertin *et al.*, 2013a; Fabich *et al.*, 2008). Ainsi, différentes stratégies nutritionnelles peuvent être adoptées par les EHEC en fonction de l'hôte.

#### III.2.2.1.2. Les substrats de la néoglucogenèse

L'activation de la voie de la néoglucogenèse fournit un avantage compétitif de croissance aux EHEC dans du contenu intestinal bovin, suggérant que l'assimilation des substrats néoglucogéniques est requise pour une colonisation efficace de l'intestin du bovin par les EHEC (Bertin *et al.*, 2014). De plus, les substrats de la néoglucogenèse sont impliqués dans l'activation du LEE, via les protéines Cra et KdpE, indispensables à l'adhésion des EHEC O157:H7 aux cellules épithéliales intestinales (Njoroge *et al.*, 2012). Les C<sub>4</sub>-dicarboxylates (succinate, fumarate et malate), le glycérol, le lactate et les acides aminés ont été identifiés comme les substrats néoglucogéniques constituant des sources de carbone (Figure 15) (Bertin *et al.*, 2014).

Les C<sub>4</sub>-dicarboxylates jouent un rôle important dans la production d'énergie et leur métabolisme est complètement différent en conditions aérobie ou anaérobie (Uden *et al.*, 1997; Uden *et al.*, 2016). Les enzymes nécessaires à leur catabolisme sont uniquement induites par la présence des C<sub>4</sub>-dicarboxylates dans le milieu extracellulaire. En aérobiose, les C<sub>4</sub>-dicarboxylates sont métabolisés dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et utilisés comme sources de carbone (Figure 15). Dans ces conditions d'oxygénation, les substrats sont transportés par un transporteur spécifique, DctA, qui catalyse le symport d'ions H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> avec les C<sub>4</sub>-dicarboxylates. Le métabolisme aérobie des C<sub>4</sub>-dicarboxylates requiert la succinate déshydrogénase (Sdh) qui convertit le succinate en fumarate (Janausch *et al.*, 2002; Uden *et al.*, 2016). Ce dernier sera métabolisé dans le cycle du TCA pour produire de l'énergie et des squelettes carbonés. En anaérobiose, DcuB est l'antiport fumarate/succinate majeur alors que DcuA est capable de catalyser l'antiport, l'entrée et l'excrétion des C<sub>4</sub>-dicarboxylates aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose (Uden *et al.*, 2016). Une fois à l'intérieur de la bactérie, le malate est converti en fumarate par la fumarase FumB, et sera utilisé comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. Le succinate produit au cours de la

respiration sous l'action de la fumarate réductase est ensuite excrété dans le milieu extracellulaire par les transporteurs DcuA et DcuB (Uden *et al.*, 2016).



**Figure 15 : Voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des substrats néoglucogéniques de la souche EHEC O157:H7 EDL933 incubée *in vitro* dans du contenu intestinal bovin** (Bertin *et al.*, 2014). Les gènes surexprimés de la souche EHEC EDL933 incubée en contenu intestinal bovin comparé à un milieu synthétique sont indiqués en rouge, et ceux non altérés en noir. Les flèches bleues indiquent les réactions irréversibles de la voie de la néoglucogenèse. G3P : glycérol 3-phosphate ; G3P-ROH : glycérophosphodiester ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; PEP : phosphoénolpyruvate ; Pi : phosphate inorganique ; UQ : ubiquinone ; UQH2 : ubiquinol.

Le glycérol, détecté à une concentration de 5,8 mM dans du contenu intestinal bovin, est un constituant majeur des phospholipides des membranes des cellules eucaryotes et procaryotes. Le glycérol peut ainsi être libéré dans la lumière intestinale au cours du renouvellement de l'épithélium intestinal et de la lyse des bactéries du microbiote intestinal (Bertin *et al.*, 2014). C'est également un constituant de la ration alimentaire des animaux qui peut atteindre l'intestin grêle. Le lactate est produit par des bactéries du microbiote intestinal, telles que *Lactobacillus* ou *Streptococcus*, et a été détecté à une concentration de 3,6 mM dans le contenu intestinal bovin (Bertin *et al.*, 2014). Le lactate et le glycérol présents dans la lumière intestinale peuvent ainsi être utilisés comme sources de carbone par les EHEC dans l'intestin. En revanche, le glycérol n'est pas impliqué dans la colonisation des EHEC O157:H7 de l'intestin murin (Fabich *et al.*, 2008).

Enfin, 45 mM d'acides aminés libres ont été détectés dans l'intestin grêle du bovin (Bertin *et al.*, 2014). Certains de ces acides aminés peuvent constituer d'importants substrats néoglucogéniques utilisés par les EHEC (Bertin *et al.*, 2014). En effet, le catabolisme de ces acides aminés conduit à la libération d'ammonium, source d'azote, et de précurseurs présents dans le cycle du TCA.

### III.2.2.2. Les sources d'azote dans le tube digestif bovin

L'utilisation de sources d'azote par les bactéries est essentielle pour leur développement optimal dans le tube digestif des mammifères. Les acides aminés aspartate, sérine et tryptophane, l'urée, l'agmatine et l'éthanolamine représentent des sources d'azote importantes nécessaires à la survie des EHEC O157:H7 dans l'intestin grêle du bovin (Bertin *et al.*, 2014).

#### III.2.2.2.1. Les acides aminés

L'aspartate et la sérine ont été détectés à une concentration de 2,4 mM et 1,8 mM, respectivement, dans des contenus d'intestin grêle bovin, constituant ainsi des sources de nutriments (Bertin *et al.*, 2014). L'aspartate et la sérine sont d'importants constituants de la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal bovin qui seront donc déversés au cours du renouvellement cellulaire (Montagne *et al.*, 2000). La sérine est également un constituant des phospholipides des membranes des cellules eucaryotes et procaryotes et est libérée suite à la lyse des entérocytes et des bactéries du microbiote. L'aspartate semble être un nutriment particulièrement intéressant pour les EHEC : (i) il est efficacement utilisé comme source d'azote et de carbone par les EHEC, (ii) il confère un avantage nutritionnel compétitif aux EHEC dans l'intestin du bovin et (iii) les EHEC métabolisent l'aspartate plus efficacement que les souches *E. coli* commensales bovines (Bertin *et al.*, résultats non publiés). Ainsi, bien que l'aspartate ne soit pas impliqué dans la colonisation des *E. coli* O157:H7 chez la souris (Fabich *et al.*, 2008), cet acide aminé semble être important pour la croissance des EHEC dans l'intestin grêle du bovin.

#### III.2.2.2.2. L'éthanolamine

L'éthanolamine (EA) est une petite molécule présente dans le phosphatidyléthanolamine (PE), un des composants majeurs de la membrane des cellules de l'animal, des plantes et des bactéries. Ce composé est libéré dans le tractus digestif lors de la lyse de cellules végétales provenant de l'alimentation, de cellules intestinales ou de bactéries du microbiote intestinal. Les *E. coli* O157:H7 adhèrent spécifiquement aux molécules de PE de la membrane des cellules intestinales alors que les autres bactéries du microbiote, dont les *E. coli* commensaux, ne possèdent pas cette propriété. Cette adhésion provoque la mort de cellules intestinales et par conséquent la libération de fragments cellulaires dans la lumière intestinale (Barnett Foster *et al.*, 2000). De plus, les cellules épithéliales possèdent une activité phospholipase D qui hydrolyse le PE endogène conduisant à la libération d'EA libre dans la lumière intestinale. Les souches EHEC mettent ainsi en place une stratégie spécifique d'acquisition accrue de l'EA. Chez le bovin, l'EA libre a été détectée dans le rumen (7,7 nM), le caecum (12,3 nM) et le côlon (17,3 nM) mais c'est dans l'intestin grêle que la quantité la plus importante a été retrouvée (2,8 mM) (Bertin *et al.*, 2011). Ainsi, dès leur entrée dans l'intestin grêle, les souches EHEC capables de résister aux conditions hostiles du rumen, disposent d'une source intéressante d'azote favorisant leur multiplication. L'information génétique nécessaire à la dégradation et à l'utilisation de l'éthanolamine requiert 17 gènes portés sur l'opéron *eut* (ethanolamine utilization). Le transporteur EutH est requis pour le transport de l'EA lorsque le pH est faible ou que la concentration extracellulaire en EA est faible (Penrod *et al.*, 2004). Cependant, il semble également que l'EA puisse diffuser passivement au travers des membranes bactériennes lorsque sa concentration est suffisante. Deux réactions enzymatiques convertissent ensuite l'EA en



acétyl-CoA (Ac-CoA). D'abord, l'éthanolamine amonia-lyase (EAL) convertit l'EA en acétaldéhyde et en ammonium en présence de cobalamine. Puis, l'acétaldéhyde est converti en Ac-CoA par l'acétaldéhyde déshydrogénase (EutE). L'Ac-CoA peut entrer dans le cycle du TCA pour produire des sources d'énergie et de carbone. Dans des conditions où l'énergie est limitée, l'Ac-CoA est converti en acétyl-phosphate par la phosphotransacétylase (EutD) puis en acétate par l'acétate kinase. L'accumulation d'Ac-CoA peut entraîner la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol par l'alcool déshydrogénase (EutG). Les protéines EutS, EutM, EutN, EutL et EutK sont nécessaires à la formation d'un carboxysome requis pour conserver les métabolites volatiles et toxiques tels que l'acétaldéhyde et concentrer les enzymes nécessaires au catabolisme de l'EA. Le transport et le catabolisme de l'EA chez la souche EHEC EDL933 sont représentés sur la Figure 16.

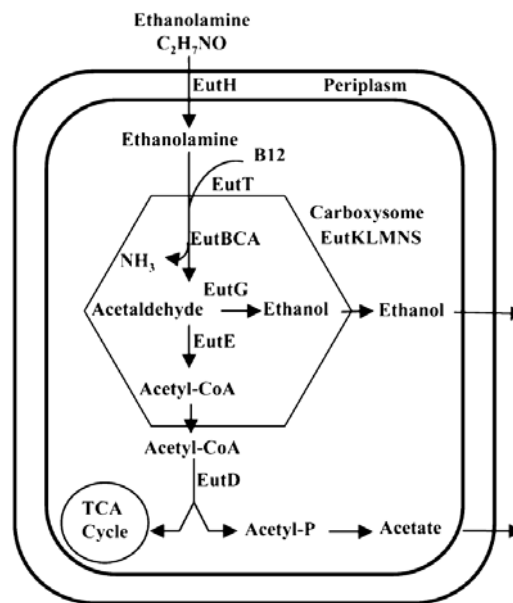


Figure 16 : Voie de dégradation de l'éthanolamine chez la souche EHEC O157:H7 EDL933 (Bertin *et al.*, 2011).

Dans l'intestin grêle du bovin, les EHEC O157:H7 sont capables d'utiliser l'EA comme seule source d'azote et l'EAL, codée par le gène *eutB*, est indispensable à la libération d'ammonium et à son utilisation comme source d'azote (Bertin *et al.*, 2011). Par ailleurs, les souches EHEC O157:H7 utilisent plus efficacement l'EA que les *E. coli* commensaux bien que ces souches possèdent l'opéron *eut* (Bertin *et al.*, 2011). Chang *et al.* (2004) ont également montré qu'une souche *E. coli* commensale humaine déficiente pour l'utilisation de l'EA ne présentait pas de défaut de colonisation dans l'intestin de souris traitées à la streptomycine. D'autre part, les enzymes nécessaires à l'assimilation de l'EA sont absentes des phyla majeurs constituant 99% du microbiote digestif bovin (Bertin *et al.*, 2011). Les souches EHEC étant minoritaires au sein du microbiote intestinal, ne sont donc pas compétitives pour l'utilisation de nutriments facilement assimilables par l'ensemble ou une grande partie de la communauté microbienne. En accord avec la théorie de Freter, les souches EHEC se sont ainsi spécialisées dans l'assimilation d'un nutriment particulier non assimilable par les autres bactéries composant le microbiote intestinal, conférant aux EHEC O157:H7 un avantage nutritionnel pour la survie et la colonisation de ces pathogènes dans l'intestin grêle du bovin.

## III.2.2.3. Stockage des sources de nutriments

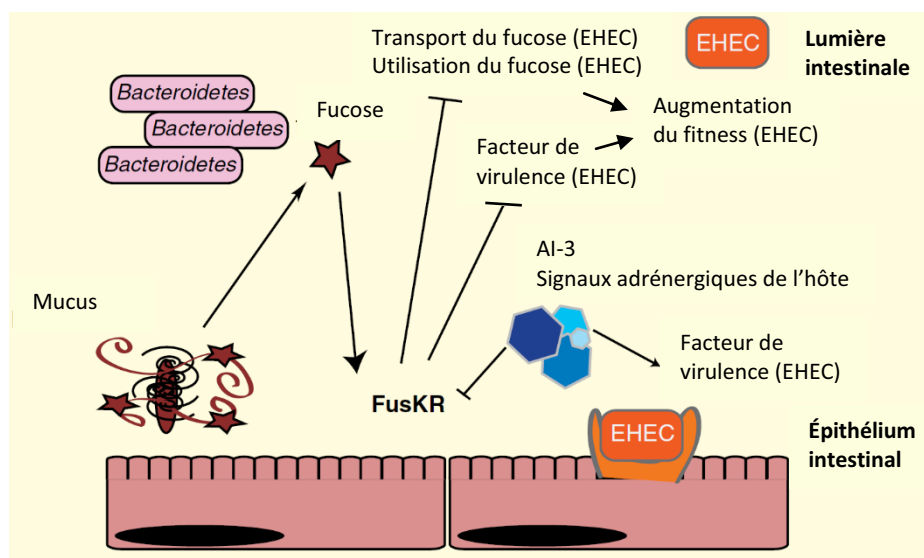
Dans l'intestin, représentant un écosystème très compétitif, les nutriments préférentiellement utilisés par les EHEC O157:H7 sont présents en quantité variable et limitée, d'où la nécessité pour la bactérie de stocker de l'énergie. Le glycogène est la principale molécule de stockage de carbone et d'énergie identifiée chez de nombreuses bactéries, dont les *E. coli*. Le glycogène est synthétisé lorsque que les sources de carbone sont abondantes mais les autres nutriments limités. A l'inverse, la dégradation du glycogène survient lorsque les sources de carbone deviennent limitantes et impliquent la formation d'intermédiaires tels que le maltose. Les enzymes nécessaires au stockage de sources de carbone sous la forme de glycogène ainsi qu'à sa dégradation sont importantes pour la persistance des EHEC O157:H7 dans le tube digestif de la souris (Jones *et al.*, 2008). Ainsi, le catabolisme du maltose est essentiel à l'initiation de la colonisation de l'intestin murin par les *E. coli* O157:H7 en présence d'*E. coli* commensaux (Jones *et al.*, 2008).

## III.2.2.4. Compétition avec le microbiote endogène pour les sources de nutriments

Les souches EHEC sont très minoritaires au sein des bactéries du microbiote intestinal de l'animal. En accord avec la théorie de Freter, il semble ainsi que les souches EHEC se soient spécialisées dans une assimilation efficace des sucres simples issus du mucus alors que certaines bactéries du microbiote intestinal consomment préférentiellement les polymères de ces sucres (Amaretti *et al.*, 2006). La compétition nutritionnelle entre les souches EHEC O157:H7 et les *E. coli* commensaux a été particulièrement étudiée dans le modèle de souris traitée à la streptomycine. *In vivo*, les souches *E. coli* commensales et EHEC utilisent des sucres différents ce qui suggère que ces bactéries pourraient occuper des niches intestinales bien distinctes, permettant aux *E. coli* pathogènes de coloniser efficacement l'intestin en présence d'*E. coli* commensaux (Fabich *et al.*, 2008; Maltby *et al.*, 2013). Cependant, dans l'intestin de souris, les *E. coli* commensaux et pathogènes peuvent également être en compétition pour les mêmes nutriments (Leatham *et al.*, 2009). La flexibilité métabolique semble alors être un processus essentiel à la colonisation simultanée de souches *E. coli* dans l'intestin. Pour survivre, les *E. coli* utilisent différentes stratégies nutritionnelles : (i) ils peuvent assimiler des nutriments non utilisés par le microbiote intestinal y compris les *E. coli* commensaux, (ii) utiliser les mêmes nutriments mais plus efficacement que les bactéries du microbiote ou (iii) résider dans des biofilms mixtes. En effet, la présence de souches EHEC au sein de biofilms mixtes représente également une stratégie nutritionnelle leur permettant d'assurer leur survie. Ces biofilms mixtes sont composés de bactéries anaérobies, telles que *Bacteroides*, *Enterobacter* et *Clostridia*, qui sont capables de dégrader les polysaccharides en sucres simples nécessaires à la survie des *E. coli*. Il a été suggéré que différentes souches d'*E. coli* interagissaient physiquement et métaboliquement avec des biofilms mixtes afin de disposer localement de différentes sources de nutriments (Conway *et al.*, 2015). Ceci pourrait expliquer pourquoi certaines souches *E. coli* utilisent des sucres différents dans l'intestin alors *qu'in vitro*, ces souches présentent un profil nutritionnel identique (Fabich *et al.*, 2008; Maltby *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les EHEC ont développé un système leur permettant d'utiliser plus efficacement des sources de nutriments, en particulier le fucose, que les *E. coli* commensaux pour survivre et atteindre l'épithélium intestinal (Figure 17). En effet, bien que le fucose soit important pour la colonisation intestinale du tube digestif des mammifères par des EHEC O157:H7, les *E. coli* commensaux sont

également capables de métaboliser ce nutriment (Fabich *et al.*, 2008; Maltby *et al.*, 2013; Snider *et al.*, 2009). Chez *E. coli*, l'utilisation du fucose requiert : (i) les gènes *fuc*, dont l'expression est liée à l'import de fucose et (ii) leur régulateur FucR induit par le fucose 1-phosphate. En réponse spécifique au fucose, un senseur FusK et un régulateur FusR (système à deux composants) répriment le transport du fucose, diminuant ainsi les niveaux intracellulaires de fucose 1-phosphate (Pacheco *et al.*, 2012). Les gènes codant les protéines FusKR sont présents chez les EHEC O157:H7 et absents chez les *E. coli* commensaux, et sont induits au contact du mucus intestinal. Par ailleurs, le système à deux composants FusKR est également capable d'inhiber l'expression du LEE, augmentant ainsi le fitness des EHEC dans la couche de mucus intestinal (Pacheco *et al.*, 2012). Une fois proche de l'épithélium intestinal, des protéines Qse du quorum sensing répriment FusKR en réponse à des signaux, tels que des molécules adrénérergiques ou sécrétées par le microbiote intestinal, permettant l'activation du LEE nécessaire à la colonisation intestinale des EHEC (Pacheco *et al.*, 2012).



**Figure 17 : Modulation du métabolisme et de la virulence des EHEC en réponse au fucose**, adaptée de Keeney *et al.* (2013). Les bactéries du microbiote intestinal, telles que les Bacteroidetes, permettent la dégradation de polysaccharides issus du mucus intestinal et la libération de fucose libre dans la lumière du tube digestif. En réponse au fucose et au contact du mucus, les protéines FusKR sont activées et répriment le transport et le catabolisme du fucose ainsi que des facteurs de virulence tels que le LEE. Au niveau de l'épithélium intestinal, des molécules signal produites par le microbiote ou par les cellules intestinales de l'hôte inhibent FusKR, levant ainsi la répression sur le LEE et permettant la colonisation efficace des EHEC.

### III.2.3. La chaîne respiratoire

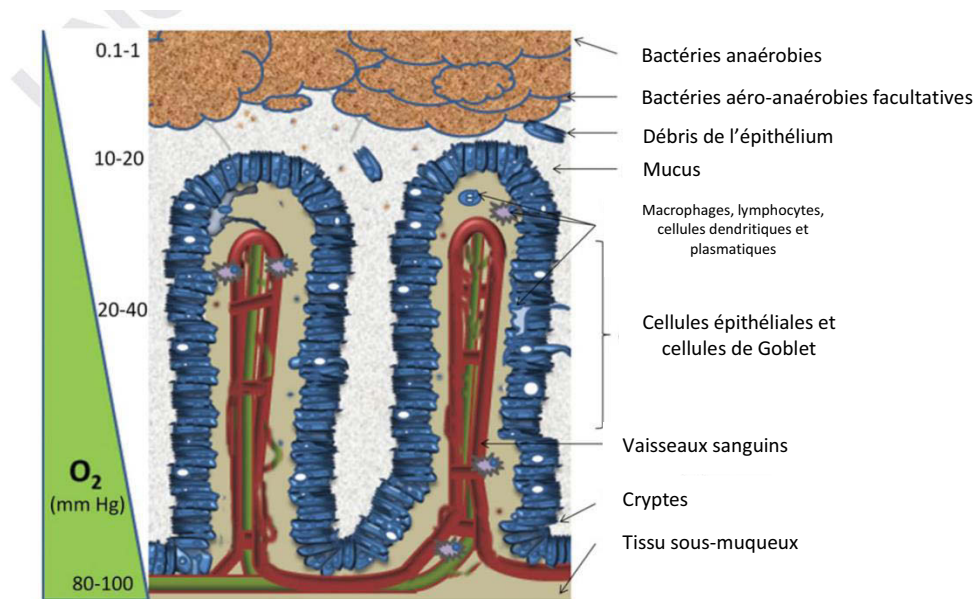
La respiration est un processus fondamental pour toutes les cellules vivantes. Elle se déroule dans la membrane interne des bactéries et est composée de transporteurs d'électrons, tels que les quinones, qui transfèrent séquentiellement les électrons d'un donneur vers un accepteur. L'énergie libérée au cours du processus de transfert d'électrons est nécessaire à la translocation de protons  $H^+$  au travers la membrane plasmique conduisant à la formation d'un gradient électrochimique de protons nécessaire à la synthèse d'ATP. Chez les *E. coli*, la chaîne respiratoire inclut 15 déshydrogénases et 10 oxydases ou réductases terminales liées par des quinones et exprimées dans des conditions spécifiques qui dépendent de la disponibilité en oxygène (Buono *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2010; Uden & Bongaerts, 1997). Les *E. coli* sont capables de synthétiser trois différentes quinones : les

ubiquinones (UQ), les ménaquinones (MQ) et les déméthyl-ménaquinones (DMQ) (Uden & Bongaerts, 1997). En condition aérobie, les principales quinones sont les UQ qui seront remplacées par les MQ et DMQ en anaérobiose (Uden & Bongaerts, 1997). L'ensemble des déshydrogénases, oxydases et réductases chez *E. coli* inclut des isoenzymes pour certains donneurs d'électrons ( $H_2$ , formate, NADH et glycérol 3-phosphate) et accepteurs d'électrons ( $O_2$  et nitrate) (Uden & Bongaerts, 1997). Les enzymes de la chaîne respiratoire chez *E. coli* sont répertoriées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Les enzymes de la chaîne respiratoire chez *E. coli*, adapté de Price & Driessen (2010).**

Enzyme	Réaction catalytique	Condition d'expression	Structure	Localisation
NADH déshydrogénase I	$NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^-$	Aérobie et anaérobie	NuoA-H	Cytoplasmique
NADH déshydrogénase II	$NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^-$	Aérobie	Ndh	Cytoplasmique
Succinate déshydrogénase	$Succinate \rightarrow Fumarate + 2H^+ + 2e^-$	Aérobie	SdhABCD	Cytoplasmique
Fumarate réductase	$Fumarate + 2H^+ + 2e^- \rightarrow Succinate$	Anaérobie	FrdABCD	Cytoplasmique
Formate déshydrogénase N	$Formate \rightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$	Anaérobie	FdnGHI	Périplasmique
Formate déshydrogénase O	$Formate + NAD^+ \rightarrow CO_2 + NADH$	Aérobie	FdoGHI	Cytoplasmique
Hydrogénase 1	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	Anaérobie	HyaABC	Périplasmique
Hydrogénase 2	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	Anaérobie	HybOABC	Périplasmique
Hydrogénase 3	$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$	Anaérobie	HycBCDEFG	Cytoplasmique
TMAO réductase	$TMAO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow TMA + H_2O$	Anaérobie	TorAC	Périplasmique
DMSO réductase	$DMSO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow DMS + H_2O$	Anaérobie	DmsABC	Cytoplasmique
Nitrate réductases	$NO_3 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$	Anaérobie	NarGHJI NarZYWV NapABC	Cytoplasmique Cytoplasmique Périplasmique
Nitrite réductase	$NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \rightarrow NH_4^+ + 2H_2O$	Anaérobie et micro-aérobie	NrfABCD	Périplasmique
Cytochrome <i>bo</i> <sub>3</sub> oxydase	$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	Aérobie	CyoABCDE	Cytoplasmique
Cytochrome <i>bd</i> oxydase	$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	Faible aération Micro-aérobie	CydAB CyxAB	Cytoplasmique Cytoplasmique
Cytochrome oxydase III	$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	Aérobie	AppBC	Cytoplasmique
Lactate déshydrogénases	$Pyruvate \rightarrow Lactate + 2H^+ + 2e^-$	Aérobie	LctD, Dld	Cytoplasmique
Glycérol 3-phosphate déshydrogénases	$Glycérol\ 3\text{-phosphate} \rightarrow Dihydroxyacétone + 2H^+ + 2e^-$	Aérobie Anaérobie	GlpD GlpACB	Cytoplasmique Cytoplasmique
Aminoacide déshydrogénase	$Acides\ aminés \rightarrow \alpha\text{-Cétoacide} + NH_4^+$	Aérobie	DadA	Cytoplasmique
Pyruvate oxydase	$Pyruvate + H_2O \rightarrow Acétate + CO_2 + 2H^+$	Aérobie	PoxB	Cytoplasmique
Glucose déshydrogénase	$Glucose + NAD^+ \rightarrow Gluconolactone + NADH + H^+$	Aérobie	GcD	Cytoplasmique
ATP synthase	$3ADP + 3Pi + 10H^+ \rightarrow 3ATP + 10H^+$	Aérobie et anaérobie	AtpA-I	Cytoplasmique

Chez les bactéries aéro-anaérobie facultatives telles que les *E. coli*, les accepteurs d'électrons sont souvent utilisés dans un ordre spécifique. L'intestin des mammifères n'est pas strictement anaérobie puisque des micropoches d'oxygène sont présentes à la surface de l'épithélium intestinal du mammifère et que la respiration aérobie des *E. coli* est essentielle à leur implantation dans le tube digestif (Jones *et al.*, 2007). Dans l'intestin, il s'établit un gradient de concentration en oxygène (Figure 18). La concentration en oxygène diminue de l'épithélium intestinal (80-100 mm Hg) vers la lumière intestinale (0,1-1 mm Hg) et n'impacte pas la population des bactéries anaérobies du microbiote intestinal (Espey, 2013).

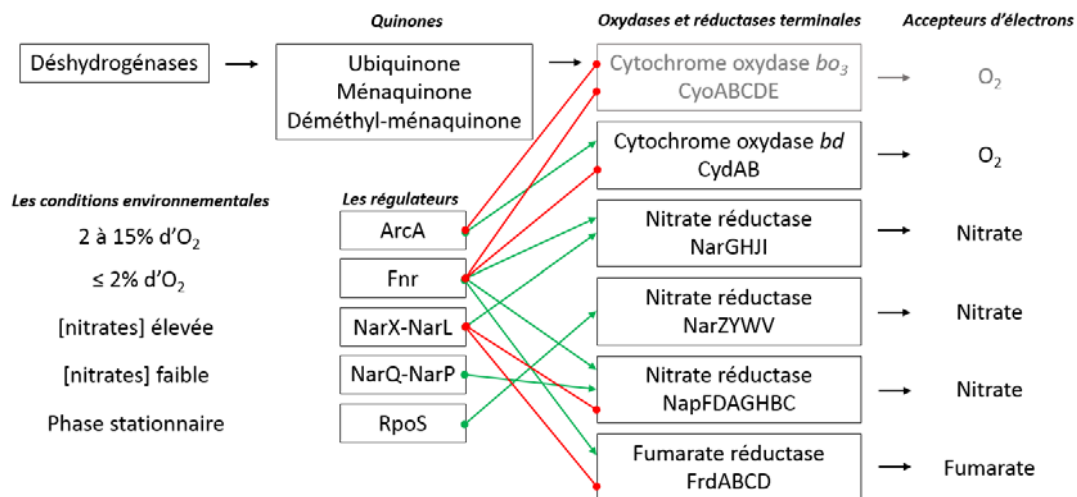


**Figure 18 :** Schéma représentant le gradient de concentration en oxygène de l'épithélium à la lumière intestinale, adaptée de Espey (2013).

L'utilisation de l'oxygène via les oxydases CydAB et CydDC, est indispensable à l'établissement et à la persistance des *E. coli* commensaux et des EHEC O157:H7 dans l'intestin du mammifère (Jones *et al.*, 2007). De plus, en utilisant l'oxygène disponible, les *E. coli* favorisent la stabilité du microbiote intestinal anaérobie en baissant le potentiel d'oxydo-réduction. Dans l'intestin, l'oxygène est cependant limité, indiquant que la respiration anaérobie contribue fortement à sa colonisation par les *E. coli*. En effet, les bactéries aéro-anaérobie facultatives sont capables de croître rapidement en présence d'oxygène puis, une fois l'oxygène épuisé, d'activer la respiration anaérobie ou la fermentation. Au cours de la respiration anaérobie, *E. coli* peut utiliser trois systèmes pour la respiration nitrate, NarG, NarZ et NapA-D et un système pour la respiration fumarate, FrdA. Le fumarate est produit de manière endogène à partir de la dégradation des glucides via la glycolyse et le cycle du TCA et provient également des C<sub>4</sub>-dicarboxylates, alors que les nitrates, chez l'Homme, proviennent essentiellement de l'alimentation. Dans le tube digestif de la souris, seul NarG contribue à la respiration nitrate des bactéries au cours de leur colonisation du tube digestif alors que NarZ, induit par le facteur RpoS, a un rôle dans la réponse au stress des bactéries (Bueno *et al.*, 2012). Le nitrate étant limité dans l'intestin, sa faible disponibilité permettrait l'expression de la fumarate réductase FrdA (Jones *et al.*, 2011). Ainsi, le nitrate et le fumarate sont les seuls accepteurs d'électrons utilisés par les EHEC au cours de la respiration anaérobie dans l'intestin de la souris (Jones *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2011). Bien que l'oxyde de triméthylamine (TMAO) et l'oxyde de diméthylamine (DMSO) représentent des accepteurs d'électrons alternatifs chez *E. coli* en absence d'oxygène, ils ne sont pas impliqués dans la colonisation du tube digestif de la souris (Jones *et al.*, 2011). Enfin, en absence d'accepteur d'électrons, *E. coli* est capable d'utiliser la fermentation des glucides et de produire de l'acétate, de l'acide formique, de l'acide succinique, de l'acide lactique et de l'éthanol (Stecher, 2015).

Chez *E. coli*, la flexibilité respiratoire en réponse au changement de la disponibilité en oxygène est gouvernée par les régulateurs ArcA et Fnr qui sont exprimés respectivement dans des conditions aérobie et anaérobie (Bueno *et al.*, 2012). Le contrôle de la chaîne respiratoire par ces deux

régulateurs est essentiel pour la colonisation de l'intestin de la souris par les EHEC (Jones *et al.*, 2007). Cependant, ArcA non seulement active CydAB mais régule également l'inhibition des oxydases CyoA-E qui ne sont pas impliquées dans la colonisation de l'intestin de souris par les EHEC O157:H7 (Jones *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2011). De plus, la respiration aérobie via CydAB fournit un avantage compétitif de croissance aux EHEC O157:H7 par rapport à la respiration anaérobie du nitrate et du fumarate. Cet avantage de croissance indique que l'environnement microaérobie de l'intestin de la souris est requis pour sa colonisation par les EHEC O157:H7 (Jones *et al.*, 2011). La Figure 19 récapitule les éléments importants de la chaîne respiratoire indispensables à la colonisation efficace des EHEC O157:H7 dans l'intestin murin.



**Figure 19 : La chaîne respiratoire chez *E. coli* O157:H7 selon différentes conditions environnementales,** adaptée de Jones *et al.* (2007). Les réductases et oxydases utilisées par *E. coli* sont indiquées en noir. Les oxydases n'affectant pas la colonisation des *E. coli* sont indiquées en gris. Les régulateurs clés de la chaîne respiratoire sont également indiquées. Les flèches vertes représentent une activation et les flèches rouges une répression.

Ainsi, le succès de la colonisation du tube digestif du mammifère par les EHEC repose sur la capacité des bactéries à survivre dans des conditions limitées en oxygène et à produire de l'énergie, sous la forme d'ATP. Pour cela, les EHEC utilisent les chaînes respiratoires aérobies (dont l'accepteur final d'électrons est l'oxygène) et anaérobie (dont les accepteurs finaux d'électrons sont le nitrate et le fumarate) au cours de la colonisation. Ces différents systèmes démontrent la flexibilité et la faculté des bactéries aéro-anaérobies facultatives, telles *E. coli*, à cataboliser de nombreuses réactions par des mécanismes alternatifs.

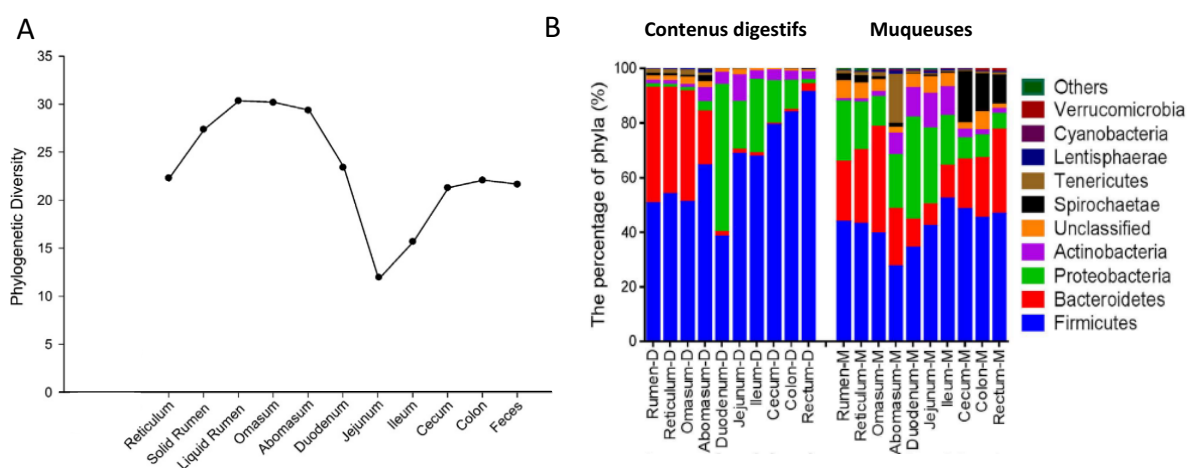
*Conclusion III.2. : Pour survivre dans l'intestin bovin, les EHEC ont besoin d'énergie et de sources de carbone et d'azote pour se maintenir dans cet écosystème. Ces sources de nutriments peuvent être apportées par l'alimentation de l'animal mais également par des composés déversés par l'animal dans son tube digestif. L'étude des voies métaboliques utilisées par les EHEC dans le tube digestif du bovin nous permettra de mieux connaître les composés préférentiellement utilisés par les EHEC pour se maintenir dans le tube digestif bovin.*

### III.3. Interactions des EHEC avec le microbiote intestinal

Les paramètres physico-chimiques du tube digestif des bovins (pH et potentiel d'oxydo-réduction) sont favorables au développement d'une communauté complexe et diversifiée de microorganismes, principalement anaérobies stricts. Le microbiote est ainsi constitué de procaryotes (archées et bactéries) et d'eucaryotes (champignons et protozoaires). Le tube digestif des mammifères contient de l'ordre de  $10^{11}$  bactéries/g de contenu appartenant à plus de 1000 espèces différentes. L'ensemble de ces microorganismes a un rôle majeur dans la nutrition, mais aussi dans le développement et le maintien de la santé de leur hôte.

#### III.3.1. Diversité du microbiote intestinal bovin

A la naissance, le tube digestif des ruminants est rapidement colonisé par une communauté abondante et diversifiée de micro-organismes (McAllister *et al.*, 1994). Les premiers colonisateurs sont les bactéries aérobies et anaérobies facultatives (majoritairement les *Enterobacteriaceae*, les *Enterococcus spp.*, les *Streptococcus spp.* et les *Staphylococcus spp.*), issues de l'environnement et de la mère, rapidement supplantés par des microorganismes anaérobies qui s'installent selon une séquence bien déterminée pour constituer le microbiote de l'adulte (Fonty *et al.*, 1987; Fonty *et al.*, 1989; Fonty *et al.*, 1988; Jami *et al.*, 2013). Chez les ruminants, la diversité microbienne de l'ensemble du tube digestif n'est pas encore bien caractérisée. En effet, de nombreuses études se sont concentrées sur l'étude de la diversité du microbiote du rumen et des fèces qui, avec les autres segments digestifs, présentent des communautés bactériennes bien distinctes (Figure 20A et B) (de Oliveira *et al.*, 2013; Malmuthuge *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2015). De manière générale, les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria représentent les trois phyla majeurs du microbiote tout le long du tube gastro-intestinal du bovin, bien que leur abondance relative diffère en fonction des segments digestifs considérés (Figure 20B).



**Figure 20 : Représentation de la diversité du microbiote intestinal tout le long du tube digestif de l'animal, adaptée de de Oliveira *et al.* (2013); Mao *et al.* (2015). (A) Variation de la diversité phylogénétique dans les différents contenus de tube gastro-intestinal de bovin. (B) Distribution des séquences d'ADNr 16S des contenus digestifs et des muqueuses intestinales du bovin.**

Dans le rumen, les bactéries constituent la communauté microbienne la plus abondante. Elles sont généralement retrouvées de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  cellules/g de contenu et représentent environ 60% à 70% de la biomasse microbienne (Tableau 2) (Mao *et al.*, 2015; Russell *et al.*, 2001). Ce sont majoritairement des bactéries anaérobies qui sont essentielles à la nutrition de leur hôte. Ces bactéries occupent différentes niches écologiques. Il est estimé que  $\frac{1}{4}$  d'entre elles sont libres dans la phase liquide et  $\frac{3}{4}$  sont attachées aux particules alimentaires (McAllister *et al.*, 1994). Une faible proportion d'entre elles, de l'ordre de 1%, est attachée à l'épithélium ruminal (McAllister *et al.*, 1994). Les bactéries du rumen ont été affiliées à 19 phyla différents identifiés par le séquençage de l'ADNr 16S (Cole *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Cependant, de la naissance à l'âge adulte, la diversité du microbiote ruminal des bovins évolue considérablement (Jami *et al.*, 2013). Chez les veaux nouveau-nés (âgés de un à trois jours), les Proteobacteria, les Firmicutes et les Bacteroidetes représentent respectivement environ 40%, 35% et 20% de la communauté bactérienne totale (Jami *et al.*, 2013). Les 5% restants sont majoritairement affiliés aux phyla Actinobacteria et Verrucomicrobia (Jami *et al.*, 2013). Chez les bovins adultes, les phyla Firmicutes et Bacteroidetes représentent jusqu'à 90% de la communauté bactérienne (Figure 20B) en dépit d'abondances relatives différentes entre les animaux ayant le même régime alimentaire (Jami *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2012). Dans une moindre mesure, les Proteobacteria et les Actinobacteria sont retrouvés dans des proportions inférieures à 5% (de Oliveira *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2015). Toutefois, la composition du phylum Bacteroidetes change considérablement en fonction de l'âge des animaux. Chez les animaux nouveau-nés, il est principalement composé du genre *Bacteroides* alors que chez les animaux plus âgés, il est presque exclusivement composé du genre *Prevotella* (50% de la population totale) (Jami *et al.*, 2013; Jami & Mizrahi, 2012). Dans le feuillet (omasum) et la caillette (abomasum), la diversité microbienne diminue et la diversité la moins élevée est observée dans le jéjunum (Figure 20A). La diversité microbienne augmente dans l'iléon et reste élevée dans le caecum, le côlon et le rectum (Figure 20A) (de Oliveira *et al.*, 2013; Malmuthuge *et al.*, 2014). Dans les fèces de bovins, la population bactérienne est estimée à plus de  $10^{10}$  bactéries/g de fèces (Tableau 2). De nombreuses études ont caractérisé la diversité bactérienne du microbiote fécal du bovin par séquençage de l'ADNr 16S (Dowd *et al.*, 2008; Durso *et al.*, 2010; Ozutsumi *et al.*, 2005). Bien que l'ensemble de ces études indiquent que les phyla majoritaires sont les Bacteroidetes (avec les genres *Prevotella* et *Bacteroides*), les Firmicutes (avec les genres *Ruminococcus* et *Clostridium*) et les Proteobacteria (avec le genre *Succinivibrio*), l'abondance relative de ces différents groupes bactériens varie considérablement selon les études. Ces différences sont probablement dues au régime alimentaire, à la race et à l'âge des animaux mais aussi au nombre limité d'animaux et/ou à la méthodologie utilisée. Cependant, Durso *et al.* (2010) ont également mis en évidence une grande variation dans la structure de la communauté bactérienne au niveau de l'espèce bactérienne entre les animaux, qui ne peut être attribuée ni à la race, à l'âge et au régime alimentaire des animaux ni à des facteurs environnementaux tels que la saison, suggérant une variation individuelle (Durso *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la composition du microbiote intestinal associé aux contenus digestifs bovins diffère de celle du microbiote associé aux muqueuses digestives de l'animal. D'une part, l'abondance relative des trois phyla majeurs du microbiote intestinal est différente entre les contenus et les muqueuses intestinales quelque soit le segment digestif (Figure 20B) (Malmuthuge *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). D'autre part, le microbiote associé aux muqueuses intestinales présente une diversité plus riche que celui des contenus, excepté pour le compartiment du rumen (Malmuthuge *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2015).



Enfin, la densité bactérienne totale est également différente en fonction du segment digestif (Tableau 2) (Mao *et al.*, 2015). Parmi les bactéries du microbiote intestinal, les *E. coli* représentent de 0,1 à 1% des bactéries cultivables totales du tube digestif (Wells *et al.*, 2014b). De même, la population totale d'*E. coli* est variable en fonction du compartiment digestif. Dans les contenus de rumen, les *E. coli* sont détectés à moins de  $10^4$  bactéries/g de contenu alors que des concentrations plus importantes ont été rapportées dans les contenus des compartiments digestifs postérieurs ( $10^5$ - $10^7$  bactéries/g) (Wells *et al.*, 2014b).

**Tableau 2 : Densité bactérienne (bactérie/g) déterminée par PCR quantitative des contenus digestifs et muqueuses intestinales prélevés sur six bovins laitiers (Holstein) âgés de 5 ans, adapté de Mao *et al.* (2015).**

Compartiment digestif	Contenu digestif	Muqueuse intestinale
Rumen	$(7,79 \pm 1,52) \times 10^{10}$	$(5,84 \pm 0,64) \times 10^{10}$
Réseau	$(7,50 \pm 1,1) \times 10^{10}$	$(3,51 \pm 0,49) \times 10^{10}$
Feuillet	$(6,81 \pm 0,43) \times 10^{11}$	$(6,51 \pm 0,95) \times 10^{10}$
Caillette	$(3,05 \pm 1,32) \times 10^{10}$	$(3,42 \pm 0,75) \times 10^{10}$
Duodénum	$(1,14 \pm 0,20) \times 10^9$	$(4,93 \pm 0,39) \times 10^9$
Jéjunum	$(4,36 \pm 1,47) \times 10^{10}$	$(6,35 \pm 0,46) \times 10^9$
Iléon	$(4,81 \pm 1,33) \times 10^{10}$	$(7,74 \pm 1,51) \times 10^9$
Caecum	$(2,13 \pm 0,33) \times 10^{10}$	$(5,48 \pm 0,29) \times 10^9$
Côlon	$(7,62 \pm 1,64) \times 10^{11}$	$(4,95 \pm 0,42) \times 10^9$
Rectum	$(7,35 \pm 2,13) \times 10^{10}$	$(4,04 \pm 0,16) \times 10^9$

Des archées, des protozoaires et des champignons sont également retrouvés dans les écosystèmes digestifs des ruminants. Les archées sont essentiellement anaérobies et méthanogènes et jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des microbiotes digestifs en assurant l'élimination d' $H_2$ , connu pour son effet inhibiteur sur les fermentations. Dans le rumen, les archées représentent moins de 4% de la population microbienne ( $10^8$ - $10^{10}$  cellules/ml) et appartiennent majoritairement au phylum des *Euryarcheota*. Ainsi, le genre *Methanobrevibacter*, appartenant à l'ordre des Methanobacteriales, et le genre *Methanomicrobium*, appartenant à l'ordre des Methanomicrobiales, sont les plus abondants (Janssen *et al.*, 2008). Les protozoaires, dominés par le genre *Entodinium* (90% des protozoaires totaux), peuvent représenter jusqu'à 50% de la biomasse ruminale ( $10^5$ - $10^6$  individus/ml) (Kittelmann *et al.*, 2011). Ils sont considérés comme des régulateurs de la population bactérienne. Quant aux champignons, ils ne représentent que 8 à 20% de la biomasse microbienne du rumen ( $10^3$ - $10^5$  zoospores/ml). Ils sont anaérobies stricts et appartiennent au phylum des *Neocallimastigomycota* qui comprend une unique classe, les *Neocallimastigomycetes*, et un unique ordre, les *Neocallimastigales* (Hibbett *et al.*, 2007). Les genres *Piromyces* et *Neocallimastix* sont les plus abondants chez les ruminants domestiques (Kittelmann *et al.*, 2013).

### III.3.2. Corrélation entre la diversité du microbiote intestinal et la prévalence des O157:H7 chez les bovins

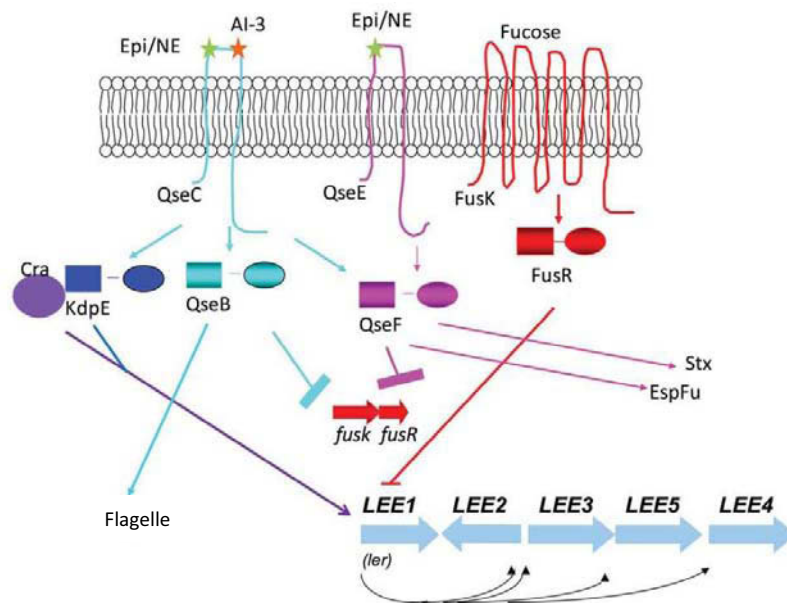
Le microbiote intestinal est capable d'empêcher efficacement une infection par des bactéries pathogènes intestinales, un processus appelé la résistance à la colonisation (effet de barrière). Quatre mécanismes ont été proposés pour expliquer ce processus (Stecher *et al.*, 2008) : (i) le microbiote intestinal peut directement inhiber la croissance des pathogènes via la sécrétion de métabolites ayant des propriétés bactéricides (bactériocines), (ii) le microbiote est capable d'utiliser une large variété de nutriments et ainsi empêcher le développement des pathogènes (carence

nutritionnelle), (iii) il peut stimuler le système immunitaire et/ou (iv) peut diminuer les propriétés de virulence des pathogènes en modifiant le niveau d'expression des gènes de virulence. Par exemple, le microbiote intestinal de rats à microbiote humain inhibe l'expression des gènes du LEE des EHEC O157:H7 (Le Bihan *et al.*, 2015). De plus, l'espèce bactérienne *Bacteroides thetaiotaomicron*, appartenant au microbiote intestinal, est capable d'inhiber l'expression des gènes codant la toxine Stx2 en internalisant la vitamine B<sub>12</sub> libérée dans le milieu intestinal exclusivement par les procaryotes et connue pour stimuler la production de Stx2 (Cordonnier *et al.*, 2016; de Sablet *et al.*, 2009).

Chez les bovins, la corrélation entre la diversité du microbiote intestinal et l'excrétion et la prévalence des STEC O157:H7 a été étudiée chez des veaux et des bovins adultes (Mir *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2013). Les résultats indiquent d'une part, que les bovins adultes présentent une diversité microbienne plus importante que les veaux et, d'autre part, que cette forte diversité bactérienne correspond à un faible taux d'excrétion et de prévalence des STEC. Ces études suggèrent ainsi que la diversité du microbiote intestinal est un facteur qui affecte la survie, la colonisation et l'excrétion des STEC O157:H7. Il semble que l'augmentation de l'abondance des espèces du genre *Clostridium* et *Bacteroides* soit associée à une augmentation de l'excrétion de STEC dans les fèces alors que la diminution de la quantité d'espèces du phylum Firmicutes est corrélée à une absence d'excrétion des STEC (Zhao *et al.*, 2013). Les effets inhibiteurs du microbiote intestinal sur la croissance des *E. coli* O157:H7 ont été étudiés *in vitro*, cependant les mécanismes d'inhibition sont encore mal connus (Shin *et al.*, 2002). *In vitro*, la croissance des *E. coli* O157:H7 dans du contenu de rumen bovin est inhibée par le microbiote endogène, probablement en raison de l'augmentation des AGV sécrétés et de la diminution du pH (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Cette inhibition de croissance des *E. coli* O157:H7 n'a cependant pas été observée en suspensions fécales bovines (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Les AGV, issus de la fermentation des bactéries du microbiote intestinal, sont retrouvés à des concentrations variables dans le tube digestif animal et jouent un rôle important dans le développement de la fonction intestinale des bovins. Il a été proposé que les bactéries productrices de butyrate pourraient contribuer à l'inhibition de la croissance des STEC *in vitro* et à la diminution de la prévalence chez les bovins adultes (Shin *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'acétate, le propionate et le butyrate et des substances bactéricides produites par les bactéries anaérobies du microbiote intestinal, ainsi qu'un faible pH sont nécessaires à l'inhibition de la croissance des O157:H7 *in vitro* (Shin *et al.*, 2002). De plus, certains AGV, comme le butyrate, régulent l'expression de gènes de virulence des EHEC (Nakanishi *et al.*, 2009).

L'interaction entre les EHEC et le microbiote intestinal passe également par des mécanismes de communication faisant intervenir des molécules chimiques. Le quorum sensing est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « auto-inducteurs » (AI) produites en phase exponentielle de croissance bactérienne. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces AI interagissent avec un régulateur transcriptionnel de l'expression spécifique de certains groupes de gènes au sein d'une même population bactérienne, permettant ainsi l'adaptation des bactéries dans un environnement donné. Les AI sont des petites molécules diffusibles dérivées de peptides chez les bactéries à Gram positif et d'acides gras chez les bactéries à Gram négatif. Chez *E. coli*, plusieurs systèmes de quorum sensing ont été décrits, tels que les systèmes AI-1 (SdiA), AI-2 et AI-3/adréraline/noradréraline (Sperandio, 2010). Les auto-inducteurs AI-2 et AI-3, impliqués dans la communication intra- et inter-espèce, ont été découverts chez les

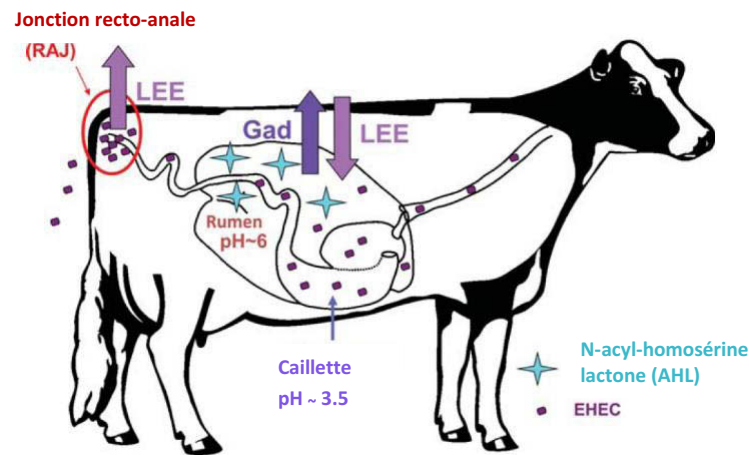
bactéries à Gram négatif (dont les EHEC) et positif et induisent la transcription et l'expression de gènes de virulence et de métabolisme chez les EHEC (Pifer *et al.*, 2014; Sperandio *et al.*, 2001). De plus, l'AI-3 partage des voies de signalisation avec le système adrénérgique via un récepteur bactérien identique, QseC, capable de détecter, en plus de l'AI-3, l'adrénaline et la noradrénaline. Un autre récepteur, QseE, est capable de détecter uniquement les catécholamines. En réponse à la détection de ces molécules, QseC et QseE vont activer l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion, la colonisation ou la virulence des EHEC, telles que le flagelle, le LEE, les Shiga-toxines et EspFu ainsi que des protéines impliquées dans la résistance à l'acidité et dans le chimiotactisme (Mellies & Lorenzen, 2014; Pifer & Sperandio, 2014). Les voies de signalisation dépendantes des récepteurs bactériens QseC et QseE sont représentées sur la Figure 21.



**Figure 21 : Cascade de signalisation dépendante de QseC et QseE** (Pifer & Sperandio, 2014). L'auto-inducteur AI-3, l'adrénaline (Epi) et la noradrénaline (NE) sont capables d'activer l'expression de gènes impliqués dans la formation du flagelle et dans la virulence des EHEC. Comme indiqué précédemment, QseC et QseE inhibent la transcription des gènes *fusKR*, permettant l'activation du LEE. De même, les protéines Cra et KdpE sont impliquées dans l'activation du LEE dans des conditions néoglucogéniques.

L'un des AI-1 les plus étudiés est le N-acyl-homosérine lactone (AHL), sécrété par les bactéries à Gram négatif du microbiote intestinal et majoritairement impliqué dans la communication inter-espèce. Le quorum sensing via les AHL implique deux protéines : (i) LuxI, responsable de la production des AHL et (ii) LuxR, activé par les AHL, qui va induire la transcription de certains gènes. Les *E. coli* ne possèdent pas le gène *luxI* et sont donc incapables de produire les AHL. Ces bactéries possèdent cependant un homologue de LuxR, la protéine SdiA, qui est essentielle à la colonisation et à la persistance des *E. coli* O157 dans l'intestin du bovin (Dziva *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2013; Sheng *et al.*, 2013). Chez les bovins, les AHL ont uniquement été détectés dans le rumen (Figure 22) (Hughes *et al.*, 2010). Ainsi, les AHL produits par les bactéries du microbiote ruminal activent SdiA qui va induire l'expression des gènes *gad* impliqués dans la résistance à l'acidité, permettant aux EHEC de survivre dans ce compartiment acide (Figure 22) (Hughes *et al.*, 2010). De plus, en réponse aux AHL, SdiA réprime la transcription des gènes du LEE dans le rumen qui n'est pas considéré comme un site de colonisation et de multiplication des EHEC (Hughes *et al.*, 2010; Kanamaru *et al.*, 2000). La survie des

*E. coli* O157:H7 dans le rumen facilite leur passage dans l'intestin dans lequel le LEE n'est plus réprimé par SdiA, permettant aux EHEC de coloniser efficacement l'intestin du bovin (Figure 22) (Hughes *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2013).



**Figure 22 : Implication du régulateur SdiA dans la colonisation des EHEC chez le bovin**, adaptée de Pifer & Sperandio (2014). Dans le rumen, le régulateur de transcription SdiA réprime l'expression du LEE et active les gènes *gad* des souches EHEC en présence des AHLs. Dans les autres compartiments digestifs, en absence d'AHL, le LEE est activé permettant l'établissement de la colonisation des EHEC.

*Conclusion III.3. : Le microbiote intestinal bovin est complexe et se compose d'une grande variété de microorganismes. De ce fait, la composition et la structure du microbiote intestinal de jeunes bovins ont été étudiées. Nous avons recherché, d'une part, si l'inoculation expérimentale d'une souche STEC O157:H7 impactait le microbiote, et d'autre part, si le microbiote influençait la colonisation et l'excrétion de la souche O157:H7.*

### III.4. Stratégies de contrôle du portage de STEC chez les bovins

Le contrôle efficace du portage des STEC par les bovins passe notamment par la réduction de leur prévalence et de l'intensité de leur excrétion fécale mais aussi par le contrôle des niches environnementales dans lesquelles ces souches pathogènes peuvent survivre. Des pratiques globales, relevant des bonnes pratiques d'élevage, ainsi que des pratiques ciblées sur le portage intestinal des STEC peuvent être envisagées afin de limiter le portage sain par les ruminants, et donc l'excrétion fécale de ces pathogènes (Dunière *et al.*, 2012). Ces stratégies permettraient (i) de limiter la propagation des EHEC dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire de l'homme et par conséquent de réduire les toxi-infections humaines et (ii) de réduire des pertes financières dans les filières de production concernées (viande et fromage).

#### III.4.1. Les pratiques d'élevage

Dans l'environnement, de nombreux éléments ont été identifiés comme sources de dissémination des STEC (fèces, effluents, sol et eau) dans lesquels les STEC peuvent survivre pendant de longues périodes. Plusieurs stratégies de contrôle peuvent être envisagées afin de limiter le risque de

contamination et de recontamination des animaux comme l'adoption de bonnes pratiques de manipulation, de compostage et d'épandage du lisier et du fumier. De même, de mauvaises conditions de logement du bétail peuvent être évitées par un nettoyage régulier. Par ailleurs, le maintien des abreuvoirs propres permettrait de contrôler la contamination de l'eau dans les élevages. Enfin, la détection d'animaux super-excréteurs et leur isolement dans les troupeaux permettraient également de limiter la circulation des STEC au sein de l'élevage (Matthews *et al.*, 2006). Cependant, le dépistage de ces animaux n'est pas simple.

#### III.4.2. La ration alimentaire

La modification de la ration alimentaire de l'animal avant l'abattage représente une des actions préventives mises en place pour diminuer la prévalence des STEC dans les élevages (Callaway *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009). L'objectif est de modifier l'environnement intestinal en faveur de groupes de bactéries susceptibles d'entrer en compétition avec les STEC O157:H7. Cependant, aucune corrélation entre le régime alimentaire et l'excrétion des STEC n'a permis de définir de nouvelles pratiques nutritionnelles visant à réduire l'excrétion des STEC. De la même manière, le respect d'une période de jeûne avant l'abattage, dans le but de réduire le transit intestinal, n'a pas permis de diminuer l'excrétion fécale des STEC.

#### III.4.3. Les additifs alimentaires pour les bovins : les probiotiques

Une diminution du développement des STEC peut être envisagée (i) en garantissant la qualité de l'eau du bétail par un traitement chimique adéquat, (ii) en supplémentant la ration alimentaire par des acides phénoliques ou certains prébiotiques ou (iii) en supplémentant l'alimentation des animaux par des probiotiques, essentiellement au cours de périodes de stress (période de sevrage et de post-sevrage, début de la lactation, gestation, transport, changement du régime alimentaire, abattage). L'ensemble de ces stress peut conduire à un déséquilibre du microbiote intestinal et avoir un impact néfaste sur la santé et les performances animales. L'effet de différents probiotiques a été testé *in vitro* sur la croissance et la survie des EHEC et *in vivo* sur leur portage par l'animal.

##### III.4.3.1. Les probiotiques testés en vue de réduire le portage

*In vitro*, une inhibition de la croissance des EHEC par des souches probiotiques (souches lactiques, souches non pathogènes d'*E. coli*, *Propionibacterium freudenreichii* ou des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*) a été montrée (Bach *et al.*, 2003; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Les lactobacilles, utilisés fréquemment comme probiotiques, sont connus pour leur effet inhibiteur sur de nombreux pathogènes intestinaux. Ces souches possèdent des activités antimicrobiennes grâce à la production de métabolites tels que l'acide lactique ou des bactériocines (McAllister *et al.*, 2011). Certaines souches de *Lactobacillus* spp. ont montré une activité bactéricide sur la croissance des souches O157:H7 dans du contenu de rumen dilué stérile, probablement lié à la production d'acide lactique et à la diminution du pH (Brashears *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2001). D'autre part, nous avons montré récemment au laboratoire que *L. reuteri* était capable d'inhiber complètement la croissance d'une souche EHEC dans le contenu de rumen bovin (Bertin *et al.*, 2017). Cette inhibition

totale de croissance est due à la production d'hydroxypropionaldéhyde (HPA ou reutéline) par *L. reuteri* en présence de glycérol (Bertin *et al.*, 2017). *L. reuteri* est un probiotique commercialisé chez l'Homme qui possède de nombreuses propriétés antimicrobiennes contre les pathogènes intestinaux (Talarico *et al.*, 1989). En suspensions fécales bovines, la croissance des *E. coli* O157:H7 est inhibée par une souche probiotique, *Lactobacillus acidophilus*, de manière dose-dépendante (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Ainsi, les bactéries lactiques pourraient être un outil intéressant pour contrôler le développement des *E. coli* O157:H7 dans le tractus digestif du ruminant.

*In vivo*, l'administration d'un cocktail de souches *L. acidophilus* et *P. freudenreichii* chez des veaux naturellement inoculés a engendré une baisse significative de la prévalence des *E. coli* O157 au niveau fécal, cette diminution étant dépendante de la dose de *L. acidophilus* (la dose  $10^9$  bactéries/jour/animal est la plus efficace) (Younts-Dahl *et al.*, 2005). Cependant, ce cocktail de souches, actuellement commercialisé, ne provoque pas de diminution de la prévalence des *E. coli* O157 lorsque la souche *L. acidophilus* est administrée à une concentration moins importante ( $10^6$  bactéries/jour/animal) (Cull *et al.*, 2012). L'inoculation de *L. reuteri* dans un modèle de souris axéniques a réduit la colonisation et les signes cliniques suite à l'infection par une souche EHEC (Eaton *et al.*, 2011). Enfin, l'administration de *Streptococcus bovis* et *L. gallinarum* chez des veaux expérimentalement inoculés a engendré une augmentation des AGV qui corrèle avec une rapide diminution de l'excrétion fécale des *E. coli* O157:H7 (Ohya *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'effet de plusieurs souches *E. coli* non pathogènes sur l'excrétion fécale de souches STEC de différents sérotypes (O157:H7, O26:H11 et O111:NM) inoculées chez des veaux d'une semaine ou chez des veaux sevrés de 8 à 10 semaines a été étudié. Chez les jeunes veaux, l'excrétion de souches STEC de sérotypes O26:H11 et O111:NM est diminuée mais aucun effet n'a été démontré pour les STEC O157:H7. Chez les veaux sevrés, une réduction substantielle significative des niveaux de population des STEC de sérotypes O157:H7 et O111:NM a été observée (aucun effet pour les O26:H11) (Zhao *et al.*, 2003). De plus, dans un modèle de souris traitées à la streptomycine, la pré-colonisation du tube digestif avec la souche *E. coli* Nissle 1917 inhibe la colonisation du tube digestif par des *E. coli* O157:H7, indiquant que cette souche fait obstacle à l'infection par les EHEC (Leatham *et al.*, 2009). *E. coli* Nissle 1917 est une souche humaine commensale connue pour coloniser de manière efficace le tube digestif humain et est utilisée comme probiotique pour le traitement de nombreux désordres intestinaux chez l'Homme (Sonnenborn *et al.*, 2009). La combinaison d'une ou deux souches *E. coli* commensales humaines avec Nissle 1917 pré-colonisant le tube digestif murin engendre une diminution plus rapide de l'excrétion des *E. coli* O157:H7 dans les fèces de souris (Leatham *et al.*, 2009; Maltby *et al.*, 2013). Ainsi, certaines souches *E. coli* commensales pourraient constituer des souches probiotiques.

#### III.4.3.2. Modes d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques permettant l'inhibition de la croissance et la réduction de l'excrétion des STEC chez l'animal sont encore mal connus. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été émises (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010a). Le phénomène d'exclusion compétitive a été décrit comme pouvant participer à l'efficacité des probiotiques (McAllister *et al.*, 2011). En effet, la spécialisation des EHEC dans une assimilation rapide et efficace de certains nutriments, tels que les sucres simples issus du mucus et l'EA, favorise leur persistance dans l'intestin du ruminant (Bertin *et al.*, 2013a; Bertin *et al.*, 2011). La supplémentation de l'alimentation des bovins avec des souches probiotiques entrant en compétition avec les EHEC pour ces sources de nutriments importantes

pourrait être envisagée (Forano *et al.*, 2013). Cette compétition nutritionnelle pourrait alors compromettre la survie des EHEC dans leur réservoir naturel. Le métabolisme de microorganismes probiotiques, tels que les bactéries du genre *Bifidobacterium*, pourrait également être impliqué dans l'inhibition de la survie des *E. coli* O157:H7. En effet, les AGV (acétate, propionate et lactate) produits au cours de la fermentation par les bifidobactéries acidifient le milieu intestinal, créant ainsi un environnement défavorable à la survie des *E. coli* O157:H7 (Fukuda *et al.*, 2011). Cependant, le milieu digestif renferme déjà ces composés en concentration importante du fait de l'activité fermentaire du microbiote intestinal. L'effet de peptides antimicrobiens (de type bactériocine) sécrétés par les souches probiotiques pourrait être une piste intéressante (McAllister *et al.*, 2011). Ces peptides, sécrétés par les bactéries lactiques, entrant en compétition avec les EHEC pour adhérer à la paroi intestinale permettraient d'inhiber la colonisation des *E. coli* O157:H7 (Sherman *et al.*, 2005). Il a été également envisagé que la paroi de certains probiotiques, tels que la levure *S. boulardii* puisse interagir avec les fimbriae produits à la surface des STEC et ainsi emprisonner celles-ci et/ou empêcher l'adhésion des bactéries aux entérocytes et donc la colonisation de l'intestin de l'hôte (Gedek, 1999). Les probiotiques, tels que *L. reuteri* ou *L. acidophilus* pourraient moduler, indirectement via la sécrétion de molécules, l'expression des gènes impliqués dans la survie, la colonisation ou la virulence des STEC (Jelcic *et al.*, 2008; Medellin-Pena *et al.*, 2009; Medellin-Pena *et al.*, 2007). L'emploi des probiotiques vise également à rééquilibrer le microbiote digestif dans un sens défavorable à l'implantation des EHEC (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010a). Ils pourraient influencer les interactions entre microbiote commensal, STEC et paroi digestive de l'animal et ainsi permettre de limiter la persistance des STEC, soit en stimulant l'effet barrière du microbiote soit en activant la réponse immunitaire au niveau local. Un additif probiotique à base de levures vivantes a montré *in vitro* une action de capture des STEC dans du contenu de rumen (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). Jusqu'à présent, aucun de ces mécanismes n'a été démontré *in vivo* chez le ruminant.

#### III.4.4. Les bactériophages

Les bactériophages, des virus ciblant les bactéries, pourraient être utilisés afin d'éliminer sélectivement les STEC présents dans le tractus intestinal des bovins (Sabouri *et al.*, 2017). En effet, plus de 60 phages spécifiques des *E. coli* O157:H7 ont été identifiés. *In vitro*, l'activité lytique de différents phages envers des STEC d'origine bovine ou humaine a été démontrée (Niu *et al.*, 2008). Concernant les études *in vivo*, certains traitements à base de phages testés chez les bovins ont permis une diminution transitoire de l'excrétion des *E. coli* O157:H7 sans toutefois provoquer leur élimination (Sheng *et al.*, 2006a). De plus, le devenir des phages dans l'environnement et au contact des autres microorganismes n'est pas totalement maîtrisé à ce jour. Ainsi, le traitement des bovins par des phages juste avant l'abattage ainsi que le traitement des bovins super-excréteurs seraient une stratégie intéressante pour limiter la dissémination des STEC à condition de pouvoir contrôler la dispersion des phages. Des produits vétérinaires comprenant des bactériophages ont été développés et commercialisés aux États-Unis pour lutter contre les infections à *Salmonella* et *Clostridium* essentiellement. Cependant, la thérapie par les phages n'est pas autorisée en France et en Europe, que ce soit dans le cadre de l'alimentation animale ou humaine.

#### III.4.5. La vaccination

Le recours à la vaccination contre la colonisation du tube digestif des ruminants par les STEC a été particulièrement étudié pour les *E. coli* de sérotype O157:H7. La vaccination est considérée comme une approche prometteuse afin de réduire le portage des EHEC chez les ruminants (Saeedi *et al.*, 2017). Différentes sortes de vaccins ont été produits, sans effet complètement éliminatoire des *E. coli* O157:H7, en criblant des antigènes et des facteurs de virulence spécifiques des EHEC. Certains vaccins ciblent des protéines liées à la captation et à l'utilisation du fer alors que d'autres utilisent des anticorps dirigés contre des facteurs de virulence, tels que l'AST3 ou l'intimine (Peterson *et al.*, 2007; Vilte *et al.*, 2011). Par ailleurs, des anticorps dirigés contre le LPS O157 ont été aussi testés avec succès chez les bovins (Peterson *et al.*, 2007). Enfin, l'utilisation de Shiga-toxines atténuées inhibe la colonisation intestinale de la souris par des *E. coli* O157:H7 (Zhang *et al.*, 2011). Ainsi, ces vaccins semblent efficaces sans affecter les performances du ruminant, mais leurs doses ainsi que leurs fréquences et voies d'administration peuvent impacter leur efficacité (Saeedi *et al.*, 2017).

Deux vaccins commerciaux ont été développés (Saeedi *et al.*, 2017). L'un, produit par Etipix et contenant un récepteur de sidérophores et de porines, a obtenu l'approbation du ministère américain en 2009. Le second, contenant des anticorps dirigés contre les protéines de l'AST3, a été développé par la société canadienne Bioniche Life Sciences et autorisé au Canada en 2008.

*Conclusion III.4. : De nombreuses stratégies de contrôle du portage des EHEC chez les ruminants semblent efficaces in vitro mais peu de travaux démontrent leur efficacité in vivo. L'utilisation de probiotiques, ajoutés dans l'alimentation du bétail, représenterait une stratégie nutritionnelle prometteuse visant à limiter le portage des EHEC dans le tube digestif animal.*



## OBJECTIFS DE RECHERCHE



Les ruminants, notamment les bovins, ont un rôle important dans la dissémination et la propagation des EHEC O157:H7 dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire de l'Homme. Ainsi, réduire le portage animal semble être une stratégie prometteuse pour réduire les toxi-infections humaines à EHEC. Dans ce cadre, une connaissance approfondie de la physiologie et de l'écologie des EHEC dans leur réservoir naturel, le tube digestif des bovins, est une étape primordiale pour proposer à terme, différentes stratégies visant à limiter le portage.

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont déjà permis une caractérisation de certaines des voies métaboliques préférentiellement utilisées par les EHEC dans l'intestin grêle du bovin. En effet, l'utilisation des voies de la néoglucogénèse et de dégradation de certains sucres issus du mucus intestinal et de l'éthanolamine confère un avantage compétitif de croissance aux EHEC O157:H7 dans l'intestin grêle du bovin. Ces résultats indiquent que les EHEC se sont spécialisés dans l'utilisation de nutriments leur permettant de coloniser et de se maintenir dans l'intestin grêle du bovin (Bertin *et al.*, 2013a; Bertin *et al.*, 2014; Bertin *et al.*, 2011). Toutefois, la survie des EHEC O157:H7 *in vitro* est différente en fonction du compartiment intestinal (rumen, intestin grêle, caecum et rectum), suggérant que les voies métaboliques utilisées par ces bactéries pour survivre dans le tube digestif du bovin pourraient être différentes selon le segment digestif considéré (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Par ailleurs, le microbiote endogène dominant diffère entre les différents compartiments digestifs bovins et sa structure dans les contenus est différente de celle présente au niveau des muqueuses intestinales (de Oliveira *et al.*, 2013; Malmuthuge *et al.*, 2014; Malmuthuge *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2015). Les espèces microbiennes susceptibles d'entrer en compétition avec les EHEC sont sans doute différentes selon le contenu digestif, suggérant un rôle du microbiote endogène dans la colonisation et le maintien des EHEC O157:H7 dans le tube digestif bovin. De plus, le microbiote ruminal endogène est capable d'inhiber la croissance des EHEC O157:H7, indiquant un effet barrière direct ou indirect du microbiote sur la croissance des EHEC dans l'intestin (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006).

Cette thèse s'est donc appuyée sur ces divers travaux afin de poursuivre les études engagées au laboratoire et de progresser dans la compréhension de la physiologie et de l'écologie des EHEC dans l'ensemble du tube digestif des bovins. Dans ce cadre, nous avons développé des approches de génomique et de transcriptomique pour caractériser des souches d'EHEC, et nous avons participé à un projet d'inoculation expérimentale de jeunes bovins par une souche *E. coli* O157:H7.

La **première partie** de la thèse a ainsi consisté à étudier *in vitro* le transcriptome de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 incubée dans différents contenus digestifs bovins par une approche de séquençage des ARNm (RNA-Seq). La souche EDL933 a été choisie car elle avait été précédemment étudiée au laboratoire et représente une des souches les mieux caractérisées dans la bibliographie. Les objectifs étaient de mettre en évidence les voies métaboliques, les facteurs d'adhésion et de virulence ainsi que des systèmes de résistance à différents stress nécessaires à la survie et au maintien de la souche EDL933 dans l'ensemble du tube digestif animal. Cette partie du travail fait l'objet du 1<sup>er</sup> chapitre expérimental du manuscrit.

La **deuxième partie de mon travail** porte sur la caractérisation génomique et phénotypique et le potentiel de virulence de la souche STEC O157:H7 MC2 ainsi que sa persistance dans et hors du tube digestif du bovin. La souche MC2, persistante dans un élevage français, a été isolée par l'équipe « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries » de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Ces travaux ont donc été réalisés en collaboration avec cette équipe dans le cadre d'un financement FranceAgriMer-Interbev (2014-2017) obtenu par l'ENVT et l'INRA. La recherche de facteurs d'adhésion et de virulence de la souche *E. coli* commensale bovine BG1 a également été

réalisée par une approche génomique. En effet, cette souche a été utilisée dans les travaux antérieurs du laboratoire et dans mes travaux de thèse comme souche commensale bovine de référence, par comparaison aux souches STEC/EHEC étudiées. Les résultats obtenus sont présentés dans le 2<sup>ème</sup> chapitre expérimental du manuscrit.

La **dernière partie** de la thèse, également réalisée en collaboration avec l'ENVT et dans le cadre du projet FranceAgriMer-Interbev, a consisté à développer un modèle animal dans l'objectif, à terme, de mieux comprendre et maîtriser le portage des EHEC chez les bovins. Ce projet a nécessité l'utilisation d'animaux inoculés expérimentalement par la souche STEC O157:H7 MC2, préalablement caractérisée, et d'animaux témoins non inoculés. Les objectifs étaient de caractériser l'excrétion fécale et le portage digestif de cette souche par les bovins, ainsi que l'impact du microbiote intestinal sur la colonisation de la souche MC2 dans les différents compartiments digestifs. L'interaction entre les EHEC et le microbiote animal des contenus et associé à l'épithélium intestinal a été étudiée. Ces travaux font l'objet du dernier chapitre expérimental du manuscrit.

## RÉSULTATS



## CHAPITRE I

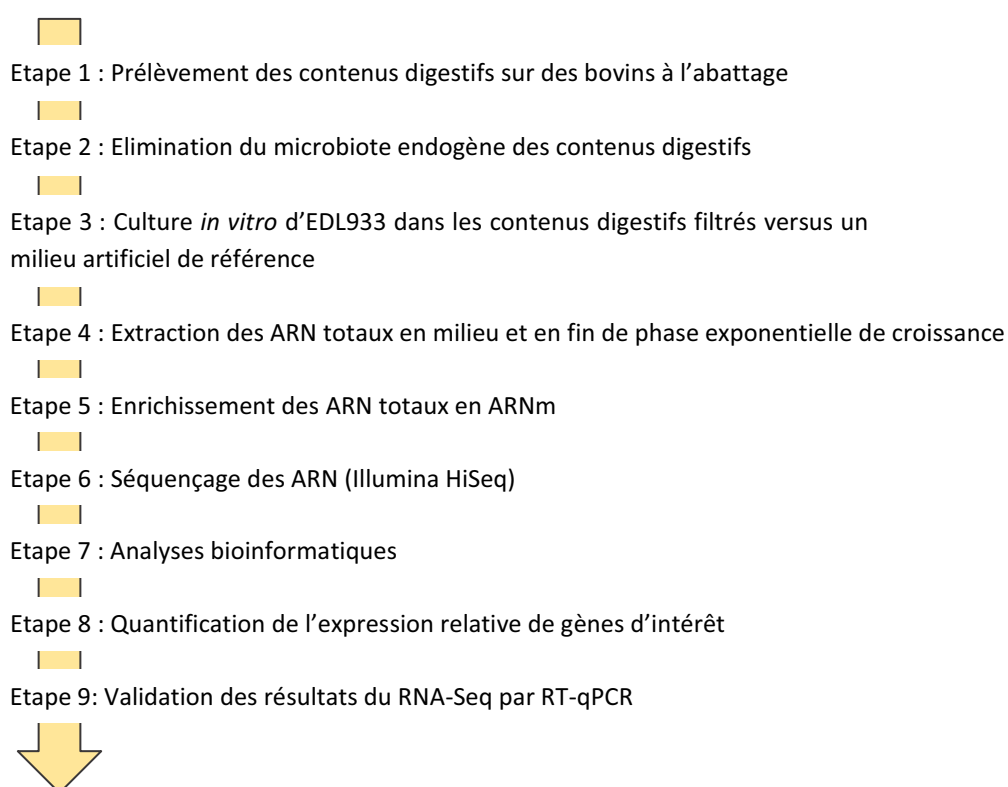
Analyse transcriptomique de la souche EHEC O157:H7  
EDL933 incubée *in vitro* en contenus digestifs bovins





## I.1. Introduction

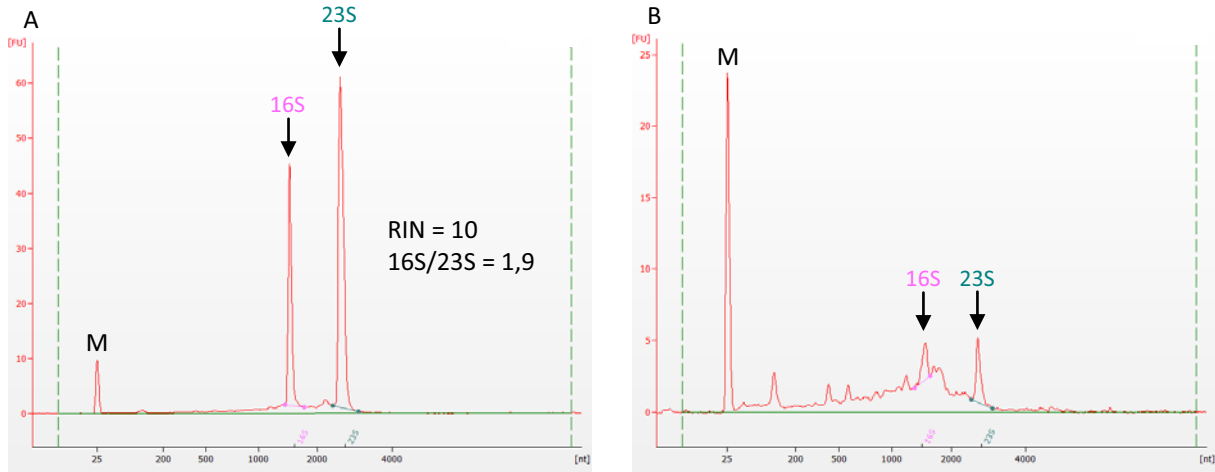
Le tube digestif du bovin est un écosystème complexe dans lequel les bactéries doivent disposer de source de nutriments et d'énergie pour survivre et se multiplier. Pour persister, les EHEC doivent interagir avec l'épithélium intestinal pour initier la colonisation. De plus, la persistance des EHEC dépend de leur capacité à résister à de multiples stress rencontrés dans le tube digestif des mammifères. La première partie du travail de thèse présentée dans ce chapitre a consisté à étudier le transcriptome de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 incubée *in vitro* dans des contenus digestifs bovins. Au préalable, la croissance de la souche EHEC O157:H7 EDL933 a été suivie *in vitro* dans les différents compartiments digestifs du bovin en présence ou en absence du microbiote commensal de ces compartiments. Les gènes impliqués dans les principales voies métaboliques, les gènes codant des facteurs d'adhésion et de virulence ainsi que ceux des systèmes de résistance au stress activés par la souche ont ensuite été étudiés. L'expression de ces gènes d'intérêt a été quantifiée dans trois compartiments, le rumen, l'intestin grêle et le rectum, et dans un milieu artificiel de référence, à l'aide d'une approche de transcriptomique globale (RNA-Seq) selon le schéma expérimental suivant :



**Figure 1 : Schéma expérimental de l'étude transcriptomique de la souche EDL933.**

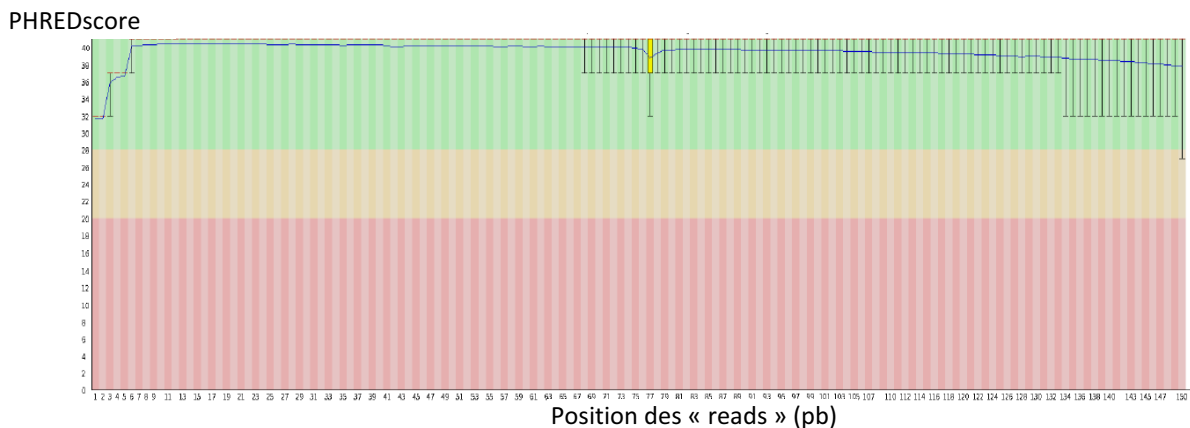
Les cultures *in vitro* de la souche EDL933 ont été réalisées dans des contenus de rumen, d'iléon et de rectum prélevés à l'abattoir pour lesquels le microbiote endogène a été éliminé par des étapes de centrifugation et de filtration. Il était en effet nécessaire de s'affranchir de la présence du microbiote endogène, dont les *E. coli* commensaux, pour étudier spécifiquement le transcriptome de la souche EDL933. Par ailleurs, les cultures ont été réalisées dans des conditions mimant celles rencontrées dans le tube digestif du bovin. Les ARN totaux ont ensuite été extraits en milieu et en fin de phase

exponentielle de croissance par une méthode d'extraction au phénol/chloroforme. La qualité des ARN a été vérifiée à l'aide du Bioanalyser 2100 (Agilent, France) avant et après l'enrichissement en ARNm (Figure 2). Les ARN obtenus après enrichissement étaient d'une qualité suffisante pour le séquençage.



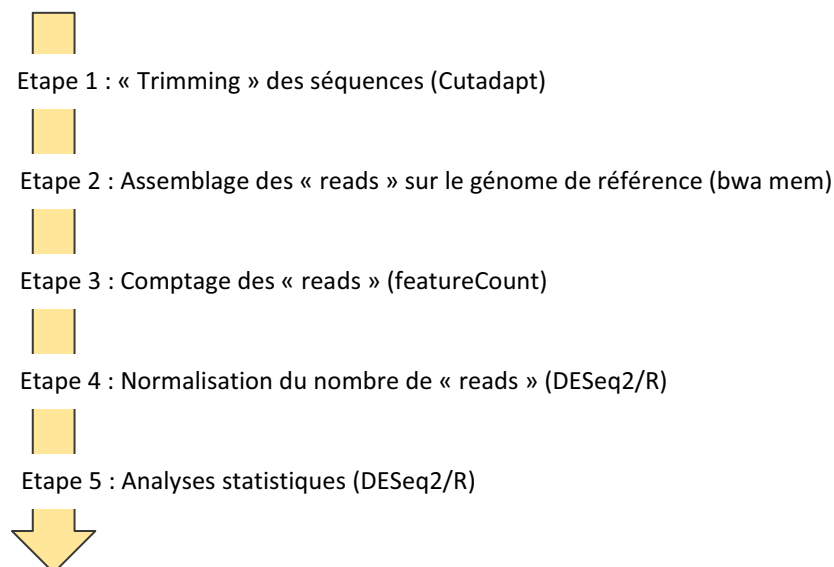
**Figure 2 : Profils des ARN au Bioanalyser 2100 Agilent.** (A) Échantillon d'ARN totaux de la souche EDL933 incubée en contenus de rumen ; (B) Même échantillon après l'enrichissement en ARNm. Les pics d'ARNr 16S et 23S sont indiqués par des flèches. Le RIN (RNA Integrity Number) et le ratio ARNr16S/ARNr23S sont également indiqués. Des résultats identiques ont été obtenus avec les autres échantillons. M : marqueur

Le séquençage des ARNm a été réalisé à la plateforme GeT-PlaGe de Genotoul de l'INRA d'Auzeville (Castanet-Tolosan, France) et a généré au total environ 770 millions de lectures (« reads ») de 150 pb. Le contrôle qualité des « reads » a également été réalisé par la plateforme à l'aide du logiciel fastQC. Un exemple est donné en figure 3 : les séquences étaient de très bonne qualité puisqu'un score qualité PHRED supérieur à 30 a été observé pour la majorité des échantillons.



**Figure 3 : Score qualité PHRED des séquences de la souche EDL933 incubée en contenu de rectum.** Un score qualité PHRED de 30 à une base signifie que la probabilité que cette base soit identifiée de manière incorrecte est de 1 pour 1000.

Nous avons ensuite réalisé l'analyse bioinformatique et statistique des données RNA-Seq selon le workflow suivant :



**Figure 4 : Workflow suivi pour l'analyse bioinformatique et statistique des données RNA-Seq.**

Les « reads » (données brutes) ont été nettoyées (élimination des adaptateurs et des « reads » de faible qualité) et l'assemblage a été réalisé sur le génome et le plasmide pO157 de la souche EDL933. Après le comptage des « reads », la normalisation a permis de quantifier les transcrits en ramenant le nombre de « reads » par kilobase (Kb) de gène cible et par millions de « reads » initiaux (exprimée en RPKM pour « Reads Per Kb per Million »). Cette étape est essentielle afin de comparer les quantifications des transcrits en fonction des différentes conditions (contenus digestifs *versus* milieu artificiel de référence). A l'issue de ces analyses, nous avons mis en évidence un grand nombre de gènes différentiellement exprimés ( $\log_2$  fold-change [FC] > |2| ;  $q$ -value < 0,05) dans la condition « contenus digestifs » par rapport à la condition « milieu artificiel ». La sur-expression de gènes ( $\log_2$  FC > 2 ;  $q$ -value < 0,05) particulièrement intéressants a ensuite été validée par RT-qPCR.

La partie des résultats concernant les voies métaboliques préférentiellement activées par la souche EDL933 pour survivre dans les contenus digestifs bovins a été présentée sous la forme d'une publication ayant pour titre : « Transcriptomic analysis reveals specific metabolic pathways of the enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strain EDL933 in bovine intestinal contents ».

Une deuxième partie des résultats concernant la mise en évidence des facteurs d'adhésion et de colonisation ainsi que des systèmes de résistance aux stress a été développée à la fin de ce chapitre.



## I.2. Transcriptomic analysis reveals specific metabolic pathways of the enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strain EDL933 in bovine intestinal contents

Manuscrit en préparation

### TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS REVEALS SPECIFIC METABOLIC PATHWAYS OF ENTEROHEMORRHAGIC *E. COLI* O157:H7 IN BOVINE INTESTINAL CONTENTS

**Audrey Segura<sup>1</sup>, Marine Bertoni<sup>1#</sup>, Pauline Auffret<sup>1#</sup>, Christophe Klopp<sup>2</sup>, Olivier Bouchez<sup>3</sup>, Clémence Genthon<sup>3</sup>, Alexandra Durand<sup>1</sup>, Yolande Bertin<sup>1</sup>, Evelyne Forano<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Plateforme Bioinformatique Toulouse, Midi-Pyrénées UBIA, INRA, Auzeville Castanet-Tolosan, France.

<sup>3</sup> GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville, Castanet-Tolosan, France

\* Corresponding author: evelyne.forano@inra.fr

# Present address:

Marine Bertoni, Institut National de Police Scientifique – Laboratoire de Police Scientifique de Marseille, Section Biologie, BP90030, 13245 Marseille, France

Pauline Auffret, Centre Ifremer du Pacifique, Département Ressources Biologiques et Environnement, Unité Ressources Marines en Polynésie Française (RMPF), BP 49, 98719 TARAVALO, Tahiti - Polynésie Française

**Keywords:** EHEC, bovine intestine, RNA-seq, metabolism, mucus-derived carbohydrates, ethanolamine, respiration

## Abstract

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are foodborne zoonotic pathogens responsible for outbreaks and the bovine gastro-intestinal tract (GIT) is considered as the main reservoir of EHEC. Documentation of the nutrients essential for EHEC growth and survival in the bovine GIT is important to develop new strategies to limit their shedding in bovine feces, and thus to reduce the risk of human contamination. To identify specific metabolic pathways used by EHEC all along the animal GIT, we compared the transcriptome of EHEC O157:H7 EDL933 grown *in vitro* in rumen, small intestine and rectum contents and in minimal medium supplemented with glucose (M9-Glc), using RNA-sequencing. The transcriptome was analyzed during the exponential and the stationary growth phases of the bacterium. Genes encoding transport and metabolism of mucus-derived sugars (galactose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, fucose, mannose and N-acetylneuraminic acid) were differentially over-expressed in the digestive contents (DC), mannose transport genes being specifically induced in rectum content. EHEC EDL933 also induced catabolic pathways for xylose, ribose, mannitol and galactitol during incubation in the three digestive contents, while that for other sugars such as arabinose, fructose, galactose and fucose were activated only in posterior DC. Genes encoding transport and metabolism of aspartate and serine, which are important constituents of bovine mucin, were activated in rumen and rectum contents. A significant up-regulation was also observed for the genes involved in glycerol and G3P transport and catabolism, suggesting that gluconeogenic pathways were used by EHEC EDL933 in the bovine GIT. Ethanolamine appears as an important substrate for EHEC all along the GIT, as genes from the *eut* operon were up-regulated in rumen, small intestine and rectum contents, even though *E. coli* EDL933 was not able to grow in rumen contents. The transcriptome analysis showed that nitrate and fumarate anaerobic respiratory systems were up-regulated in EHEC EDL933 incubated in DC compared to M9-Glc, and that some genes encoding proteins involved in aerobic respiration were also over-expressed. Our results highlighted that EDL933 is well-adapted to survive all along the bovine gut, and activates common but also specific metabolic pathways to grow and maintain in the different bovine intestinal compartments.

## 1. Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) which represent a well-known group of foodborne zoonotic pathogens distributed worldwide. Their ability to produce Shiga-toxins in the human gut constitutes the main virulence attribute and leads to diseases ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic and uremic syndrome (HUS), the principal cause of kidney failure in children (Gomes *et al.*, 2016). Numerous outbreaks and sporadic cases of severe illnesses of HC and HUS have been attributed to EHEC of serotype O157:H7 (Kaper *et al.*, 2014). Epidemiological studies indicate that the gastro-intestinal tract (GIT) of healthy bovines is the main reservoir of EHEC O157:H7 (Persad & LeJeune, 2014). Bovine are asymptomatic carriers because they do not express globotriaosylceramide, the Shiga toxin receptor necessary for the pathophysiological effects, on their intestinal and renal endothelium (Hoey *et al.*, 2002; Pruimboom-Brees *et al.*, 2000). Bovine feces excreted in the environment are the principal source of herd contamination and human infection. Human infection is typically acquired through the consumption of contaminated food (undercooked meat, dairy products, fruits and vegetables) and water as well as by direct contact with the farm environment. On farm strategies to decrease EHEC

carriage by the bovine host should efficiently reduce shedding and consequently the incidence of human EHEC infections (Saeedi *et al.*, 2017). Understanding of EHEC physiology during its transit through the bovine GIT and identifying nutrients preferentially used by EHEC to persist in the bovine gut are critical to propose nutritional strategies for limiting EHEC survival and shedding.

In the rumen, EHEC O157:H7 are able to survive but not to grow, probably due to inhibition by the endogenous microbiota or physicochemical conditions in this digestive compartment (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006; de Vaux *et al.*, 2002). Indeed, the rumen is not considered as a site for EHEC colonization which transit from there through the acidic barrier of the abomasum to posterior digestive compartments constituting more favorable environment for EHEC growth. *E. coli* O157 have been detected throughout the bovine gut of experimentally and naturally inoculated animals even if rectum is considered as the main site of EHEC colonization and multiplication (Grauke *et al.*, 2002; Keen *et al.*, 2010; Kudva & Dean-Nystrom, 2011; Lim *et al.*, 2007a; Low *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2003). However, little is known about nutrients used or metabolic pathways required for survival and/or multiplication of EHEC in the bovine intestine. The intestinal content is a complex ecosystem composed of a dense and diverse microbiota and EHEC persistence relies on competition for a variety of energy, carbon and nitrogen sources. According to the Freter theory, each bacterial species must use one or several nutrients more efficiently than other species in order to colonize the mammalian intestine (Freter *et al.*, 1983). In this complex ecosystem, available nutrients derive from animal diet as well as eukaryotic cells secretion and debris released in the luminal content from eukaryotic and prokaryotic cells apoptosis. Such nutrients can be of different nature and are present at various concentrations depending on the intestinal site. Studies from our laboratory showed that carbohydrates released from the mucus layer recovering the intestinal enterocytes (mannose, N-acetylglucosamine [GlcNAc], N-acetylneuraminic acid [Neu5Ac] and galactose) were used by EHEC to grow in the bovine small intestine content (Bertin *et al.*, 2013a). Each monosaccharide was used more rapidly by EHEC than by the endogenous microbiota *in vitro*, suggesting that EHEC could very efficiently assimilate mucus-derived carbohydrates in the bovine GIT. It has been also proposed that fucose was an important carbon source for maintenance of EHEC in the rectum of cattle (Snider *et al.*, 2009). In addition, *in vivo* colonization experiments showed that the genes *dctA* and *agaB*, encoding the specific transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylate and N-acetylgalactosamine (GalNAc), respectively, are involved in EHEC colonization in the calf intestine (Dziva *et al.*, 2004). Also, ethanolamine (EA), released in the mammal gut from phospholipids of animal, plant and bacterial cell membranes was suggested to be an important nitrogen source giving a competitive growth advantage to EHEC for persistence in the bovine small intestine (Bertin *et al.*, 2011). Furthermore, transcriptome analysis revealed that the gluconeogenesis pathway was involved in the survival and maintenance of EHEC in bovine small intestine contents (Bertin *et al.*, 2014). Several compounds such as glycerol, C<sub>4</sub>-dicarboxylate and amino acids were identified as gluconeogenic substrates present in small intestinal contents. However, little is known about the presence of these compounds in other compartments of the bovine GIT.

The objective of this study was to identify nutrients and metabolic pathways used by EHEC in various bovine digestive compartments, from rumen to rectum, in order to improve our knowledge on EHEC physiology in the bovine GIT. We compared the transcriptomic profiles of the EHEC O157:H7 reference strain EDL933 grown *in vitro* in rumen, small intestine and rectum contents and in minimal medium by RNA-sequencing (RNA-seq) approach. Quantification of transcripts differentially expressed by RNA-seq represents a method of choice to reveal the complexity of bacterial transcriptomes in complex environments such as mammalian intestine. Our objective was to assess

whether the metabolic pathways previously shown to be involved in EHEC maintenance in the small intestine were also activated in the rumen and the rectum. Our results highlighted that EDL933 is well-adapted to survive all along the bovine gut and activates common but also specific metabolic pathways to grow and maintain in the different bovine intestinal compartments.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial strains characteristics and growth conditions

The wild type *E. coli* strains and the rifampicin-resistant (Rif<sup>R</sup>) mutants used in this study were described in Table 1. Bacteria were routinely cultured on Luria Bertani (LB) agar plates. Spontaneous rifampicin-resistant (Rif<sup>R</sup>) mutants of NV95 and Sakai strains were isolated from LB agar plates containing 100 µg mL<sup>-1</sup> of rifampicin. The wild-type strains and their spontaneous Rif<sup>R</sup> mutants showed identical growth curves when incubated in LB broth at 37°C with aeration (not shown).

**Table 1 Bacterial strains**

Strain	Serotype	Origin	Genetic characteristic			Reference
			<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	
EDL933	O157:H7	HC/outbreak	+	+	+	(Latif <i>et al.</i> , 2014; Perna <i>et al.</i> , 2001; Wells <i>et al.</i> , 1983)
EDL933 Rif <sup>R</sup>	O157:H7		+	+	+	(Bertin <i>et al.</i> , 2013a; Bertin <i>et al.</i> , 2014)
Sakai	O157:H7	HUS/outbreak	+	+	+	(Hayashi <i>et al.</i> , 2001; Watanabe <i>et al.</i> , 1999)
Sakai Rif <sup>R</sup>	O157:H7		+	+	+	This study
NV95	O157:H7	Bovine feces	+	+	+	(Pradel <i>et al.</i> , 2000)
NV95 Rif <sup>R</sup>	O157:H7		+	+	+	This study
BG1	O159:H21	Bovine small intestine	-	-	-	(Bertin <i>et al.</i> , 2011; Segura <i>et al.</i> , 2017)
BG1 Rif <sup>R</sup>	O159:H21		-	-	-	(Bertin <i>et al.</i> , 2013a; Bertin <i>et al.</i> , 2014)

### 2.2. Origin and sampling of digestive contents

Eight healthy young bulls, approximately 2 years of age, were slaughtered in the experimental slaughterhouse of the “Herbipole” (National Institute for Agronomic Research [INRA], Saint-Genès-Champanelle, France) in accordance with the guidelines of the local ethics committee and current INRA ethical guidelines for animal welfare (Slaughterhouse Permit number: 63345001). Digestive contents (DC) were collected from each bull fed mix diet containing hay (80%) and concentrate (20%) (major compounds: rapeseed [26%], maize [20%], barley [14%], sunflower [8.5%], triticale colza [8.5%]). All DC from rumen, small intestine, caecum and colon compartments were collected from each animal at slaughter while rectum contents were collected two days before slaughter by rectal palpation. All DC, except small intestine contents, were collected in O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>-saturated flasks and immediately brought to the laboratory. Small intestine contents were collected from the jejunum and ileum removed in a single piece as previously described (Bertin *et al.*, 2011). Small intestine contents were directly distributed in sterile tubes without any particular attention paid regarding anaerobiosis. The other contents were processed under strictly anaerobic conditions (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006). Briefly, rumen contents were strained through four layers of cheesecloth to remove large feed particles. Caecum, colon and rectum contents were diluted 1:1 in reduced potassium phosphate buffer (50 mM potassium phosphate, resazurin 0.1%, 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mM cysteine, pH 7.6) which was prepared in order to maintain a low redox potential: the solution was boiled for at least 5 min, cooled under a 100% CO<sub>2</sub> atmosphere for 20 min and autoclaved at 120°C



for 20 min. Rumen, caecum, colon and rectum samples were distributed in sterile O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>-saturated flasks closed with rubber stoppers and sealed with aluminum caps (Bellco Glass, Vineland, N.J., USA) and in O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>-saturated Hungate tubes (Bellco). All these DC samples, containing the live endogenous microbiota and noted as unfiltered samples, were frozen at -80°C until use. These conditions were previously described as an appropriate way to maintain the viability of the bovine intestinal microbiota (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). Digestive samples from the eight animals were pooled before use. All unfiltered DC samples were confirmed to be negative for O157 *E. coli* by culturing on Sorbitol MacConkey (SMAC) agar plates (Biokar Diagnostics). Sensibility of the intestinal microbiota to rifampicin was confirmed by spotting each pooled digestive content (100 µL) on SMAC agar plates supplemented with 100 µg mL<sup>-1</sup> rifampicin before incubation at 37°C for 24h.

To remove the intestinal microbiota, half of the frozen unfiltered DC samples were thawed, pooled and centrifuged twice for 15 min at 10.000 g. The supernatants were then filtered through a Steritop and Stericup system with a membrane pore size 0.45 µm (Millipore). Filtrates, except intestine filtrates, were placed in Hungate tubes which were left without stoppers in an anaerobic chamber (JACOMEX, Lyon, France) under 80-90 ppm of oxygen during three days at room temperature. This allowed the filtrates to be under anaerobic conditions. Tubes were then recapped before getting out of the anaerobic chamber, refiltered through 0.45 µm pore-size filters (Millipore) and placed into new O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>-saturated sterile Hungate tubes. The efficacy of the filtration steps was checked by inoculating an aliquot of the filtrates into LB agar plates and overnight incubation at 37°C. Filtered DC samples were stored at room temperature until use.

### 2.3. Inoculation of *E. coli* strains in unfiltered and filtered DC samples

The wild type strains EDL933, Sakai, NV95 and BG1, and their respective spontaneous Rif<sup>R</sup> mutants were inoculated from a single colony and incubated in LB medium without antibiotic or supplemented with rifampicin (100 µg mL<sup>-1</sup>), respectively, for 7h at 37°C with aeration. The cultures were 50-fold diluted in filtered DC samples and grown overnight at 39°C without aeration. The day after, the bacterial concentration was spectrophotometrically adjusted at 600 nm to  $\approx 10^4$  colony forming unit (CFU) mL<sup>-1</sup> before inoculating unfiltered and filtered DC samples. All DC samples were finally incubated at 39°C (internal bovine temperature) i) under strictly anaerobic conditions with gentle shaking (rumen samples) or without shaking (caecum, colon and rectum samples) or ii) without any particular attention regarding anaerobiosis and without shaking in order to limit the oxygen supply in small intestine samples (oxygen-limited conditions) as previously described (Bertin *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2004). These conditions (temperature, shaking and oxygenation) were chosen to reflect the *in vivo* conditions for each bovine digestive compartments (Bertin *et al.*, 2011; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). At each time point (every two hours), an aliquot of unfiltered and filtered DC samples was 10-fold serially diluted in sterile phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4) and spotted, respectively, on SMAC agar plates supplemented with rifampicin (100 µg mL<sup>-1</sup>) or without antibiotic. The plates were incubated overnight at 37°C before counting CFU. The presented values are the log<sub>10</sub> mean number of CFU mL<sup>-1</sup>  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). Each experiment was replicated at least three times. Two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test was used to identify significant differences among strains and DC samples.  $p < 0.05$  was considered significant.

## 2.4. pH and metabolite quantification

Metabolite concentration was quantified in unfiltered and filtered DC samples. The samples were first centrifuged (10.000 x g for 10 min). For short chain fatty acid (SCFA) analysis, the supernatants were then filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) and 30  $\mu\text{L}$  of orthophosphoric acid (75%) were added to 1 mL of supernatant. Total SCFA concentrations were determined by gas chromatography. For succinate quantification, 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{ZnSO}_4$  5% and  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  3M were added to 800  $\mu\text{L}$  of supernatant. After centrifugation (10.000 x g for 10 min), the supernatant was filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) and succinate concentration was determined by high-performance liquid chromatography. All the analysis were performed by AFYREN INVESTMENT (Biopole Clermont Limagne, Saint Beauzire, France). pH measurements were performed for each sample using a HI-8424N pH meter (HANNA instruments). The presented values are the mean of at least three measures  $\pm$  SEM.

## 2.5. RNA sequencing experiments

### 2.5.1. RNA extraction and mRNA enrichment

Transcriptome analysis was performed from RNA collected when the strain EDL933 was in the exponential (3h of incubation) and the early stationary (6h of incubation) growth phases in filtered small intestine and rectum samples and after 6h of incubation in filtered rumen samples. The M9 minimal medium (Sambrook *et al.*, 1989) supplemented with glucose (40 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (0.1 mM) and trace metals (M9-Glc) was used as a reference. Briefly, EDL933 inoculated from a single colony were incubated in the same condition as described above, except that initial bacterial concentrations were adjusted to  $\approx 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  before inoculating filtered rumen samples,  $\approx 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  before inoculating filtered small intestine and rectum samples and  $\approx 10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  before inoculating M9-Glc (Fig. S1). The M9-Glc bacterial cultures were grown under limited oxygen availability, with pH values between 7.4-7.5 and at 39°C. After incubation, bacterial suspensions were centrifuged at 10.000 x g for 15 min. The supernatants were stored at -20°C for further investigation and the bacterial pellets were flash frozen in liquid nitrogen and rapidly stored at -80°C until use. The next day, the bacterial pellet was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) in 2 mL Graduated Skirted tube with tethered screw cap (BioSpec, USA) containing 600 mg 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Biospec, USA), 1 volume of AquaPhenol™ (pH 4.5) (MP Biomedicals), 1/10 volume of 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), and 3.5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoethanol (PROLABO, France). The lysis of bacterial cells was performed using a FastPrep®-24 instruments (MP Biomedicals) twice for 30 seconds with a speed of 6 m/s. Total RNA was then purified from the bacterial pellet using the Nucleospin® RNA (Macherey Nagel) according to the manufacturer recommendations. To assess DNA contamination, PCR control on each sample was performed using the *tufA* primers (5'-TGG TTG ATG ACG AAG AGC TG-3' and 5'- GCT CTG GTT CCG GAA TGT AG-3'). The RNA concentration was measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop technologies, France) and the quality of RNA was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, France). The high quality of each RNA samples was confirmed with 23S/16S rRNA ratio  $\approx 2$  and RNA Integrity Number  $\geq 8$ . Enriched fractions of mRNA were prepared using the MicroExpress™ Bacterial mRNA Purification kit (Ambion) according to the manufacturer instructions. The reduction in 16S and 23S rRNA in mRNA enriched fractions were confirmed using an Agilent 2100 Bioanalyser.

### 2.5.2. RNA Sequencing using RNA-Seq

RNA-Seq was performed at the GeT-PlaGe core facility, INRA Toulouse, France. RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols using the Illumina TruSeq Stranded mRNA sample prep kit to analyse mRNA. Briefly, after mRNA enrichment, 200 ng of mRNA were fragmented to generate double stranded cDNA and adaptators were ligated. A total of 10 cycles of PCR were applied to amplify libraries. Library quality was assessed using an Advanced Analytical Fragment Analyzer and libraries were quantified by qPCR using the Kapa Library Quantification kit. RNA-seq experiments were performed on an Illumina HiSeq3000 using a paired-end read length of 2x150 bp with the Illumina HiSeq3000 chemistry. A total of 11 to 42 million paired-reads per sample was obtained, except for the sample EDL933\_21 (122 million paired-reads) (Table S1).

### 2.5.3 Data analysis and bioinformatics

The raw read files have been stored in ng6 (Mariette *et al.*, 2012) and were checked using fastQC (Andrews). The remaining sequencing adapters were removed with cutadapt (version 1.8.3, standard parameters) (Martin, 2011). The reads were aligned to the EDL933 genome and plasmid (Genbank accession numbers NZ\_CP008957.1 and NZ\_CP008958.1) (Latif *et al.*, 2014) with bwa (version 0.7.12-r1039, mem algorithm and standard options) (CPAN). The Genbank formatted files of EDL933 chromosome and plasmid were converted to gff3 format using the perl script bp\_genbank2gff3.pl for the mapping procedure (Li *et al.*, 2009a). The alignment file was compacted, sorted and indexed with samtools (version 0.1.19-96b5f2294a, view, sort and index programs using standard parameters) (Li *et al.*, 2009b). The read pairs aligned in the genes were counted with featureCount (version v1.4.5-p1, options -s 0 -O -p -t exon -g gene\_id -a EDL933\_chr\_pl.gtf) (Liao *et al.*, 2014). The read counts were gathered in a single file with unix cut and paste commands. Before statistical analysis, the read counts corresponding to the 131 rRNA, tRNA and ncRNA coding genes of EDL933 genome were excluded (Latif *et al.*, 2014). Differential gene expression was then performed using DESeq2 version 1.12.4 (Love *et al.*, 2014) with R version 3.3.2 ("R Core Team, R: A language and environment for statistical computing," 2016) and packages ggplots2 version 2.2.0 (Wickhman, 2009) and pheatmap (Kolde) following the standard workflow. The DESeq2 method internally corrects for library size and uses negative binomial generalized linear models to test for differential expression. In this study the statistical model was built using the '~ST' design formula, where ST variable is a combination of the two factors of interest (DC and growth phases). All genes with a log<sub>2</sub> fold-change (log<sub>2</sub>FC) greater than 2 and a Benjamini-Hochberg adjusted *p*-value (*q*-value) smaller than 0.05 were reported as differentially expressed. For further analysis, additional gene annotations from older published EDL933 genomes and plasmids were collected (Genbank accession numbers CP008957.1 and CP008958.1 (Latif *et al.*, 2014) ; AE005174.2 (Perna *et al.*, 2001) and AF074613.1 (Burland *et al.*, 1998)). Additional gene annotations were performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Differentially expressed genes were assigned to functional categories of Clusters of Orthologous Groups (COGs) of proteins using blastp on the NCBI COG 2014 database (Geer *et al.*, 2010).

### 2.6. Reverse transcription followed by quantitative PCR (RT-qPCR)

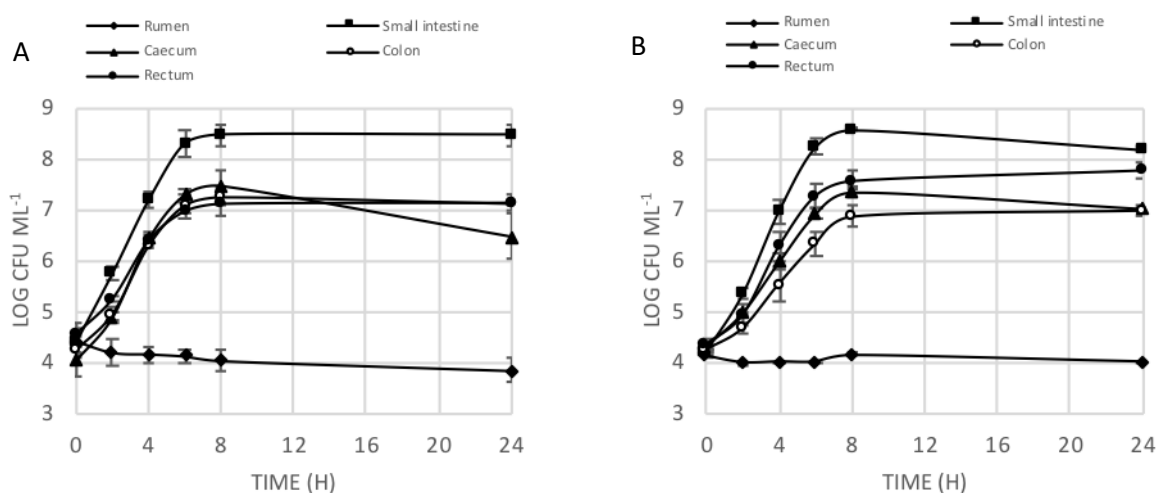
One microgram of each RNA sample (in triplicates) was reverse transcribed using the SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) with 3 µg of random primer and 100 units of SuperScript II Rnase H. Quantitative PCR runs were carried out using the Mastercycler ep realplex apparatus (Eppendorf) with 20 ng of cDNA, 0.5 mM of each primer, 3 mM of MgCl<sub>2</sub>, 10 µL of SYBR Premix Ex Taq

mix (Takara Bio Inc.) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$ . Amplification conditions were as follows: 95°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 20 s. The house keeping genes *mdh* was used for normalization of mRNA quantification (Table S2). The relative RNA quantification was performed using primers designed to specifically amplify fragments of 90 to 200 bp and described in Table S2. Control samples lacking the reverse transcriptase were included to assess DNA contamination. Triplicate samples were amplified in each case. Results were calculated using the comparative cycle threshold method. The results presented are average from at least duplicate experiments. Log<sub>2</sub>FC were considered as significantly different at  $p < 0.05$  (One-way ANOVA with the Tukey post-hoc test).

### 3. Results

#### 3.1. Growth and survival of EDL933 in bovine digestive contents

The survival ability of the EHEC O157:H7 strain EDL933 Rif<sup>R</sup> was analyzed into different digestive contents (DC) collected from rumen, small intestine, caecum, colon and rectum with their endogenous microbiota. The culture conditions were chosen to mimic the physiological environment of each DC (see the Materials and Methods section) (Bertin *et al.*, 2011; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). The spontaneous rifampicin-resistant mutants of the O157:H7 EHEC strain Sakai, of the bovine O157:H7 STEC strain NV95 and of the bovine commensal *E. coli* strain BG1 (Table 1) were also included in order to compare their growth patterns with that of EHEC EDL933.



**Fig. 1 Growth curves of EDL933 Rif<sup>R</sup> incubated in bovine digestive contents**

A: Unfiltered digestive content; B: Filtered digestive contents. Each time point is the mean of at least three independent experiments. Statistical analyses were performed with the two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test. In unfiltered DC: growth yield in small intestine content was significantly different from that in the other DC ( $p < 0.001$ ); growth yield in caecum, colon and rectum contents was significantly different from that in rumen and small intestine contents ( $p < 0.001$ ). In filtered DC: growth yield in all DC was significantly different from that in rumen content ( $p < 0.001$ ); growth yield in small intestine content was significantly different from that in caecum and colon contents ( $p < 0.001$ ); growth yield in rectum content was significantly different from that in caecum and colon contents ( $p < 0.05$ ).

As shown in Fig. 1A, EDL933 Rif<sup>R</sup> was able to grow in all DC, except the rumen. In the rumen content, a 0.5 log CFU mL<sup>-1</sup> decrease in the EDL933 Rif<sup>R</sup> population was observed after 8h of incubation and

the strain survived until 24h at low level ( $< 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>). In contrast, EDL933 Rif<sup>R</sup> grew significantly with a high yield (4 log CFU mL<sup>-1</sup> increase,  $p < 0.001$ ) in the small intestine content, and remained at high concentration up to 24h of incubation. In the other DC, the EDL933 Rif<sup>R</sup> population increased significantly ( $p < 0.001$ ) from 4 to 7 log CFU mL<sup>-1</sup> then remained stable up to 24h of incubation ( $\approx 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>). Similar results were obtained with the other *E. coli* strains incubated in each digestive content (no statistically significant difference was found between the strains) (Fig. S2). Taken together, these results indicated that the strain EDL933 as well as the other *E. coli* strains tested in this study were well-adapted to grow and/or survive along the bovine gut and that no difference could be observed between EHEC O157:H7, STEC O157:H7 and commensal strains.

SCFA concentrations and pH were measured before and after inoculation of EDL933 Rif<sup>R</sup> in the DC (Table 2). In ruminal contents, the pH became more acidic during incubation than other contents and decreased of about 1.4 pH unit after 24h of incubation (Table 2). Acidic conditions may contribute to growth inhibition of EDL933, as shown previously (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). In the other contents, pH values were all between 7 and 8 whatever the incubation time, which corresponded to more favorable conditions for *E. coli* EDL933 growth (Table 2). The total SCFA concentration was higher in ruminal contents than in the other DC before incubation (Table 2), with a high acetate concentration of 84.51 ( $\pm 6.93$ ) mM (not shown). Otherwise, the total SCFA concentration increased in all DC after 24h of incubation, suggesting a fermentative activity of the endogenous microbiota (Table 2).

**Table 2 pH and SCFA concentrations in unfiltered digestive contents at the beginning of incubation (0) and after 6h and 24h of incubation with the strain EDL933**

	Time	Rumen	Small intestine	Caecum <sup>a</sup>	Colon <sup>a</sup>	Rectum <sup>a</sup>
pH	0	7.25 ( $\pm 0.05$ )	7.22 ( $\pm 0.01$ )	7.29 ( $\pm 0.23$ )	7.42 ( $\pm 0.39$ )	7.38 ( $\pm 0.42$ )
	6h	6.30 ( $\pm 0.04$ )	7.14 ( $\pm 0.02$ )	7.90 ( $\pm 0.20$ )	7.53 ( $\pm 0.03$ )	7.46 ( $\pm 0.00$ )
	24h	5.85 ( $\pm 0.02$ )	7.66 ( $\pm 0.02$ )	7.88 ( $\pm 0.33$ )	7.38 ( $\pm 0.17$ )	7.59 ( $\pm 0.06$ )
Total SCFAs (mM)	0	115.78 ( $\pm 9.56$ )	15,75 ( $\pm 0.58$ )	36,27 ( $\pm 0.69$ )	38,49 ( $\pm 2.28$ )	19,35 ( $\pm 1.82$ )
	6h	90,80 <sup>b</sup>	31,94 <sup>b</sup>	27,66 <sup>b</sup>	37,36 <sup>b</sup>	25,01 ( $\pm 0.33$ )
	24h	129,53 <sup>b</sup>	50,31 <sup>b</sup>	37,01 <sup>b</sup>	70,61 <sup>b</sup>	50,21 ( $\pm 2.35$ )

<sup>a</sup> pH and SCFA concentrations were measured in the incubation media (i.e. after dilution of digestive contents for those which were diluted, see materials and methods)

<sup>b</sup> SCFA concentrations were measured only once for these samples

The growth of EDL933 was also monitored in filtered DC samples in order to assess the impact of the endogenous microbiota (Fig. 1B). The growth rate and yield of EDL933 grown in unfiltered or in filtered DC (Fig. 1A and B), were very similar (no significant difference with the two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test), except a slightly but not significant lower rate in filtered colon content. This suggests that the lack of growth of EDL933 in rumen content is not only due to the rumen microbiota, but also to the physicochemical conditions and/or the presence of inhibitory compounds in rumen fluid.

### 3.2. Transcriptome profiling of EHEC EDL933 incubated in filtered bovine digestive contents

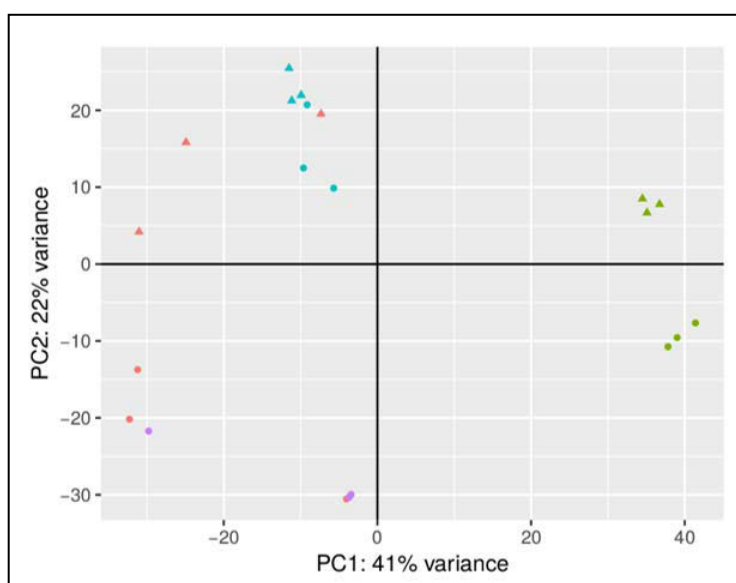
To determine nutrients and metabolic pathways preferentially used by EHEC EDL933 to survive in the bovine gut, we performed RNA-seq analysis to compare global gene expression changes in EDL933 grown in filtered intestinal contents and in minimal M9 medium supplemented with glucose as the sole carbon source (M9-Glc). Filtered rumen, small intestine and rectum contents were used for the

growth of EDL933. Transcriptomic profiles were determined with mRNA samples collected during the exponential growth phase (3h of incubation), except in rumen contents, and in the stationary growth phase (6h of incubation) (Fig.S1). For each culture condition, three biological replicates were performed. The concentration of the main SCFA present in the DC and of succinate was also quantified before EHEC EDL933 inoculation and after 3h and 6h of incubation (Table 3).

**Table 3 pH and metabolites concentrations in filtered digestive contents at the beginning of incubation (0) and after 3h and 6h of incubation with the strain EDL933**

Sample	acetate	propionate	butyrate	succinate	pH
M9-Glc 0	0.6 (± 0.03)	1.3 (± 0.05)	0.6 (± 0.02)	0	7.43 (± 0.01)
M9 Glc 3h	1.7 (± 0.11)	1.3 (± 0.07)	0.7 (± 0.04)	0	7.27 (± 0.03)
M9 Glc 6h	5.4 (± 0.28)	1.3 (± 0.06)	0.7 (± 0.05)	0	6.86 (± 0.03)
Rumen 0	92.5 (± 0.66)	18.9 (± 0.18)	12.5 (± 0.05)	0	7.28 (± 0.18)
Rumen 6h	83.7 (± 0.65)	16.9 (± 0.17)	11.1 (± 0.13)	0.6 (± 0.1)	7.13 (± 0.06)
Small intestine 0	13.3 (± 0.20)	0.8 (± 0.09)	0.2 (± 0.09)	4.5 (± 0.1)	7.95 (± 0.02)
Small intestine 3h	15.4 (± 1.89)	0.6 (± 0.21)	0.2 (± 0.03)	5.6 (± 0.5)	7.74 (± 0.14)
Small intestine 6h	21.1 (± 0.79)	4.9 (± 1.33)	0.1 (± 0.02)	9.8 (± 0.3)	7.27 (± 0.02)
Rectum 0	11.1 (± 0.17)	2.3 (± 0.17)	0.8 (± 0.16)	0	7.70 (± 0.07)
Rectum 3h	12.1 (± 0.52)	2.2 (± 0.04)	0.7 (± 0.04)	0	7.40 (± 0.04)
Rectum 6h	11.8 (± 0.30)	2.1 (± 0.04)	0.6 (± 0.02)	0	7.27 (± 0.02)

The whole transcriptomes of EDL933 grown under the different conditions were first analyzed by a principal component analysis (PCA). The first principal component (PC1, accounting for 41% of the variation) and the second principal component (PC2, accounting for 22% of the variation) together explained 63% of the variance in the RNA-Seq data (Fig. 2). The transcriptome of EDL933 grown in M9-Glc and harvested at the two growth phases formed two clusters which were distant from the other transcriptomes. In addition, the transcriptomic profiles of EDL933 grown in rumen and rectum contents also showed different patterns. On the contrary, the transcriptomes of EDL933 cultured in small intestine contents during the exponential and the early stationary growth phases were not well separated from those of rumen and rectum contents, respectively (Fig. 2). All these data indicated that genes expressed by EDL933 incubated in M9-Glc or in filtered DC were clearly different.



**Fig. 2 Principal component analysis (PCA) results for the transcriptomes of EDL933 grown in filtered rumen (purple), small intestine (red) and rectum (blue) contents compared to M9-Glc minimal medium (green) when the bacteria were harvested at the exponential (triangle) or the stationary (circle) growth phase. Three biological replicates were analyzed for each condition**

Statistical analysis revealed that 3083 of 5717 genes carried by the EDL933 genome and the pO157 plasmid were differentially expressed ( $\log_2$  fold change [FC] > |2|;  $q$  value < 0.05) when EDL933 was incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents (Table 4). The results showed that 290 to 347 genes were up-regulated and 250 to 354 genes were down-regulated depending on the DC sample and bacterial growth stage. In order to confirm these RNA-seq data, the expression of 32 genes was measured by RT-qPCR. Comparison of the results confirmed the alteration of the transcription of the genes in EHEC EDL933 incubated in rumen, small intestine and rectum contents during both growth phases relative to M9-Glc (Table S3).

**Table 4 Number of differentially expressed genes ( $\log_2$  FC > |2|;  $q$  < 0.05) in EDL933 incubated in filtered digestive contents compared to M9-Glc minimal medium**

Intestinal contents	# up-regulated genes	# down-regulated genes	Total
<b>Exponential growth phase</b>			
Small intestine	347	354	701
Rectum	290	250	540
<b>Early stationary growth phase</b>			
Rumen	337	280	617
Small intestine	346	254	600
Rectum	305	320	625
<b>TOTAL</b>			<b>3083</b>

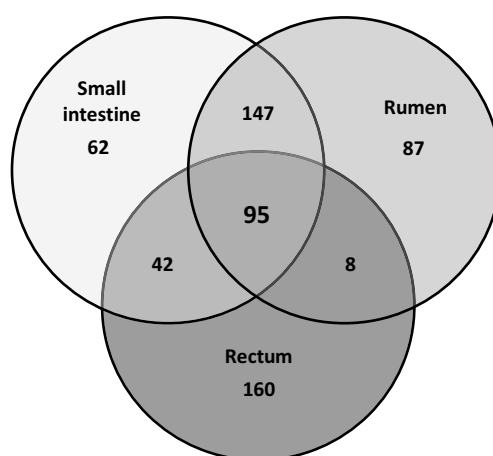
To facilitate subsequent analyses, total differentially expressed genes ( $\log_2$ FC > |2|) were classified in cluster of orthologous groups (COG) in order to assign a physiological function to each gene. The results showed that genes of unknown or unclassified function represented 22.9% of the 3083 expressed genes (Table S4). In addition, 36.4% of the differentially expressed genes in EDL933 grown in the three filtered DC were found within three functional categories: “Energy production and conversion” (321 genes), “Carbohydrate transport and metabolism” (333 genes) and “Amino acid transport and metabolism” (467 genes) (Table S4). Since the aim of this study was to progress in our understanding of the nutritional basis of EHEC survival in the bovine gut, we focused on genes up-regulated in EHEC EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents, and included in these three main functional categories.

### 3.3. Genes commonly up-regulated in EHEC EDL933 in rumen, small intestine and rectum contents

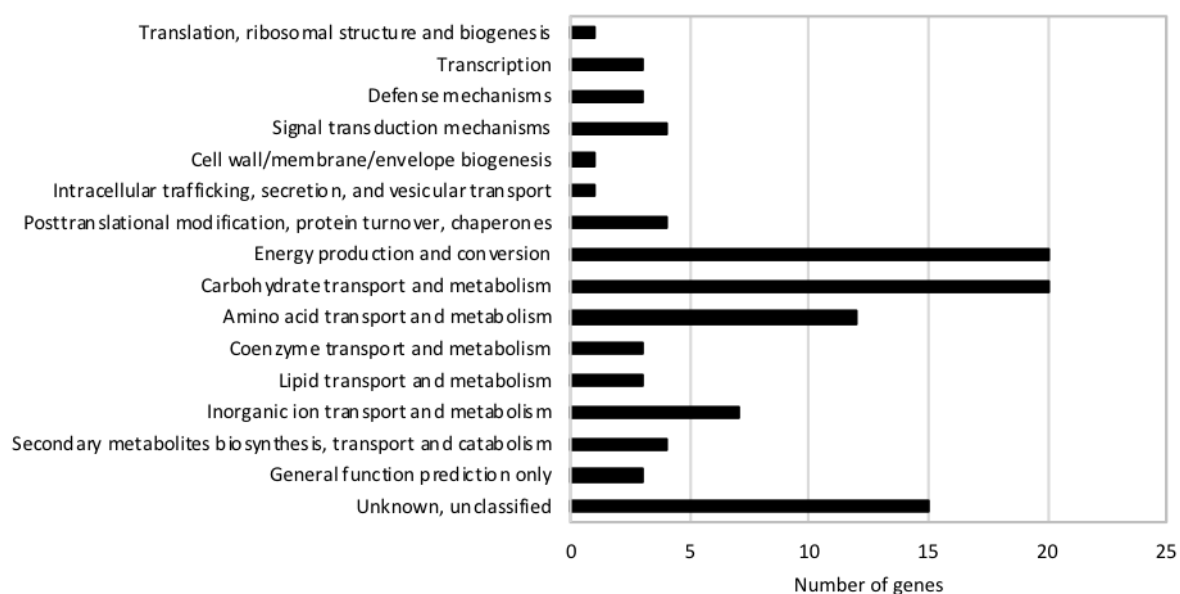
One of our objectives was to identify metabolic pathways involved in EHEC nutrition during its transit along the bovine GIT. To this, we first analyzed the genes commonly up-regulated by EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents compared to M9-Glc (Table 5).

Venn diagram indicated that 95 genes were commonly up-regulated in EDL933 in the three digestive contents at the stationary growth phase (Fig. 3). As shown in Fig. 4 and Table S5, 52 of the 95 genes (54.7%) were found within the three main functional categories discussed above. Each of the other functional categories contained less than 10% of up-regulated genes (Fig. 4). Genes of unknown and

unclassified functions represented 15.8% of the genes commonly up-regulated in the three DC (Fig. 4).



**Fig. 3 Venn diagram of up-regulated genes in EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents during the early stationary growth phase compared to M9-Glc**



**Fig. 4 Functional classification of the 95 up-regulated genes in EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents during the early stationary growth phase relative to M9-Glc**

Among the genes up-regulated in EHEC EDL933, 20 were involved in the metabolism of carbon sources (Fig. 4, Table 5). Results analysis showed that EHEC EDL933 induced pathways involved in transport and/or assimilation of xylose, ribose, mannitol, galactitol, N-acetylgalactosamine (GalNAc), glycerol and C<sub>4</sub>-dicarboxylates (Table 5). The genes *xyIF* and *xyIA*, (transport and catabolism of xylose respectively), and the genes *rbsACD* (ribose transporter), were commonly up-regulated in EDL933 grown in the three DC (Table 5). Importantly, these genes were more induced in EDL933 incubated in rectum contents ( $\log_2FC > 5$ ) than in the two other contents (Table 5). The genes *cmtB* encoding a



subunit of the mannitol transporter and the genes *z4875* and *z4876* encoding a galactitol transporter were also up-regulated (Table 5). EDL933 also induced the transcription of the genes *agaEVW* and *agaYZ* coding for the transport and the catabolism of GalNAc, respectively (Table 5). Note that the up-regulation of these genes was higher in rectum contents than in the two other DC. In addition to carbohydrates, EDL933 induced the genes encoding glycerol assimilation since a significant up-regulation was observed for the genes involved in glycerol and glycerol 3-phosphate (G3P) transport and catabolism (Table 5). The genes *glpF* and *glpT* encode specific transporters of glycerol and G3P, respectively, and *glpK* encodes the ATP-dependent glycerol kinase responsible for the synthesis of G3P from glycerol (Table 5). The gene *dctA* encodes aerobic transporter of C<sub>4</sub>-dicarboxylates (succinate, fumarate and malate) and aspartate, used by *E. coli* as carbon and energy sources (Table 5).

The transcription of 12 genes involved in the transport and assimilation of amino acids, potentially used by *E. coli* as carbon and/or nitrogen sources, was also commonly induced by EDL933 during incubation in the three DC (Fig. 4, Table 5). The genes encoding the transport and the degradation of aspartate (*dctA* and *aspA*, respectively), and the degradation of serine (*sdaA*) and tryptophane (*tnaA*) were up-regulated in EDL933 (Table 5). The genes *sdaA* and *tnaA* encode L-serine dehydratase and tryptophanase required for the conversion of serine and tryptophane to pyruvate, respectively. Aspartate ammonia-lyase (AspA) is required to convert aspartate into fumarate. The transcription of *asnA* which encodes aspartate ammonia-ligase (conversion of aspartate to asparagine) was also over-expressed (Table 5). In addition, the transcription of the genes *tdcD* and *tdcE*, involved in the degradation of serine and threonine *via* the propanoate pathway, were also induced in EDL933 incubated in all bovine DC (Table 5) (Hesslinger *et al.*, 1998). Note that all these genes were more transcribed in EDL933 incubated in rumen and small intestine contents ( $\log_2FC > 3$ ) than in rectum contents, except *sdaA* (Table 5).

### 3.4. Genes up-regulated in EDL933 incubated in posterior contents (small intestine and rectum contents)

Rumen is not considered as a multiplication and colonization site of EHEC. One of the objectives of this study was to predict nutritional compounds and metabolic pathways used by EHEC EDL933 for multiplication and maintenance in the posterior digestive contents. Indeed, the two posterior digestive compartments (small intestine and rectum) constitute more favorable environments to EHEC colonization. With this objective in mind, we focused on the commonly up-regulated genes classified in the three main functional categories described above during incubation in both small intestine and rectum contents. A total of 168 and 137 genes were commonly up-regulated in EHEC EDL933 during incubation in the two DC at the exponential and stationary growth phases, respectively (Table 5). The function of the genes products was analyzed to i) determine metabolic pathways and compounds specifically used by EHEC and ii) to propose potential sequential nutrition of EHEC during its incubation in these two posterior DC.

The transcription of genes responsible for the metabolism of mucus-derived carbohydrates (N-acetylneuraminic acid [Neu5Ac], N-acetylglucosamine [GlcNAc] and galactose) was unique to EDL933 incubation in posterior DC (Table 5). In addition, genes from the fucose utilization operon were also over-expressed in small intestine and rectum contents [*fucAIKOP*], at both growth stages, while only *fucA* and *fucO* appeared over-expressed in rumen content. Genes encoding enzymes involved in assimilation of additional carbohydrates (arabinose [*araABDFG*], fructose [*fruABK*], xylose

[*xylABFGH*], gluconate [*gntKPTU*] and hexuronate (galacturonate and glucuronate) [*uxaABC*], were also up-regulated. Note that the *ara*, *fru* and *gal* genes were mainly expressed during the exponential growth phase, but not only, and that *uxaABC* and *gntKPTU* were exclusively expressed during the exponential growth phase (Table 5). Noteworthy, the *fru* and *gal* genes were more induced in EDL933 incubated in small intestine than in rectum contents suggesting a more active arabinose metabolism in the bovine small intestine. In contrast, the genes coding the transport or assimilation of xylose, galactose and gluconate were more induced in rectum than in small intestine contents. In addition to carbohydrates, EHEC EDL933 also induced pathways involved in the transport (*sdaC*) and catabolism (*sdaB*) of serine, potentially used as carbon and/or nitrogen sources (Table 5).

### 3.5. Genes specifically expressed in EDL933 incubated in rectum contents

Because the rectum is the major site of EHEC colonization and multiplication in the bovine GIT, a particular attention was paid to the genes induced in EHEC during incubation in rectum contents. Interestingly, in addition to the up-regulated genes described above, EHEC EDL933 induced specific genes during its incubation in rectum content. The genes *malEFGK* and *manXYZ* encoding maltose and mannose uptake, respectively, were only up-regulated in EDL933 during incubation in rectum contents, mainly during the exponential growth phase. Similarly, the transcription of the genes encoding the transport (*gntT* and *gntU*) and assimilation (*gntK*) of gluconate was only induced in EDL933 during the exponential growth phase in rectum contents. In addition, the transcription of the genes coding for i) the GalNac transporter (*agaBCEFVW*) and tagatose 1,6-diphosphate aldolase (*agaYZ*) and ii) the transport (*xylF*) and catabolism (*xylAB*) of xylose was induced in EHEC EDL933 during the exponential growth phase in rectum but not in small intestine contents. Note also that the log<sub>2</sub>FC increase in *aga* and *xyl* genes expression during the early stationary growth phase was higher in rectum than in small intestine or rumen contents (Table 5). Taken together, these results suggested a potential role for maltose, mannose, xylose and/or GalNac in the nutrition or colonization of EHEC in the rectum of cattle.

The genes *sucAB* and *sucCD* encoding 2-oxoglutarate dehydrogenase and succinyl-CoA synthetase, respectively, as well as the genes *sdhABD* encoding succinate dehydrogenase were only up-regulated in EHEC EDL933 incubated in rectal contents during the early stationary growth phase.

### 3.6. Energy production and conversion

*E. coli* is a facultative anaerobe able to respire under fully aerobic, microaerobic or strictly anaerobic conditions to produce energy. A total of 20 genes associated to aerobic and anaerobic respiratory systems was up-regulated in EHEC EDL933 incubated in DC compared to M9-Glc (Fig. 4). As shown in Table 5, common and distinct respiratory systems were induced by the bacteria according to the DC. The *fdnG*, *fdoHI*, *frdABCD*, *glpABC*, *hyaABCD*, *hybABC*, *napA* and *glpD* genes were up-regulated in EHEC EDL933 in the three DC whereas *appBC*, *dmsABC*, *narGHIIJ* and *nrfCEFG* were up-regulated only in rumen and small intestine contents. The transcription of the genes *sdhABC* was only up-regulated in rectum contents. The transcription of the *nap* genes was more active in EHEC incubated in small intestine contents than in rumen or rectum contents. Surprisingly, genes encoding proteins involved in aerobic respiration appeared also up-regulated such as *appBC* during incubation of EHEC EDL933 in rumen and small intestine contents or *sdhABC* in rectum contents. Taken together, our results strongly suggested that EHEC could use distinct dehydrogenases and reductases depending of the availability of electron donors (H<sub>2</sub>, formate, succinate, G3P) and electron acceptors (oxygen, nitrate, dimethylsulphoxide and fumarate). Note that EHEC EDL933 probably activated the nitrate and

fumarate respiratory pathways and used formate, G3P and H<sub>2</sub> as electron donors in the three bovine CD.

### 3.7. Transport and assimilation of ethanolamine

Ethanolamine (EA) is an important nitrogen source that confers a growth advantage to EHEC EDL933 in the bovine small intestine content (Bertin *et al.*, 2011). Here, we focused on the genes encoding EA transport and assimilation in the different bovine DC. As expected, the transcription of *eut* genes was induced in small intestine content during the stationary growth phase (Table 5). Interestingly, the *eut* genes were also up-regulated during incubation in rumen fluid but only 7 of the *eut* genes were over-expressed during incubation in rectum content (Table 5). Note that *eutH*, encoding an active transport of EA across the bacterial membrane, was up-regulated in both small intestine and rumen contents. Our results strongly suggested that EA, constantly renewed in the bovine GIT from eukaryotic and prokaryotic membranes, was used as nitrogen source in the small intestine and the rumen but also in the rectum of cattle.

### 3.8. C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters

The transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates (fumarate, malate, succinate) and aspartate under aerobic and anaerobic conditions is well documented (Unden *et al.*, 2016). The DctA transporter catalyzes the aerobic uptake of C<sub>4</sub>-dicarboxylate whereas DcuA and DcuB catalyze anaerobic antiporting of succinate against aspartate and fumarate, respectively (Unden *et al.*, 2016). The gene *dcuB* was up-regulated in EHEC incubated in the three DC whereas the transcription of *dcuA* was only induced during incubation in small intestine and rectum contents. Surprisingly, *dctA* was up-regulated in EHEC during incubation in all the DC tested, including rumen and rectum, where EDL933 was incubated under strict anaerobiosis. Interestingly, succinate was produced by EHEC EDL933 during incubation in small intestine but not in rumen or rectum contents (Table 3) suggesting antiporting of aspartate and/or fumarate against succinate. Accordingly, *aspA* encoding aspartase (conversion of aspartate to fumarate) and *frdABCD* encoding fumarate reductase (conversion of fumarate to succinate) were also up-regulated during incubation in small intestine contents.

**Table 5 RNA-Seq data**

Gene tag	Gene	Gene product	Exponential growth phase						Stationary growth phase					
			Small intestine			Rectum			Small intestine			Rectum		
			Log2FC	q-value	Log2FC	q-value	Log2FC	q-value	Log2FC	q-value	Log2FC	q-value	Log2FC	q-value
Z2315	<i>acpD</i>	FMN-dependent NADH-azoreductase	2.53	7.91E-05	5.12	7.34E-17	3.16	6.19E-07	4.77	7.25E-15	2.38	2.65E-04		
Z4492	<i>agaB</i>	PTS system galactosamine-specific IIB component	NDE		3.01	2.87E-05	NDE		3.27	2.44E-06	NDE			
Z4493	<i>agaC</i>	PTS system galactosamine-specific IIC component	NDE		2.11	4.41E-03	NDE		2.15	1.61E-03	NDE			
Z4487	<i>agaE</i>	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IID component	NDE		3.97	1.62E-10	2.60	4.74E-05	3.99	6.14E-11	2.44	1.35E-04		
Z4488	<i>agaF</i>	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IIA component	NDE		3.23	1.41E-08	NDE		3.2	7.02E-09	2.52	1.40E-04		
Z4485	<i>agaV</i>	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IIB component	NDE		6.10	6.41E-23	3.22	5.89E-07	4.79	1.45E-14	2.52	1.40E-04		
Z4486	<i>agaW</i>	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IIC component	NDE		5.36	7.49E-22	3.37	5.24E-09	5.06	1.66E-19	3.07	1.25E-07		
Z4491	<i>agaY</i>	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase (GatY/KbaY subunit)	NDE		4.57	1.82E-13	2.54	7.96E-05	3.85	4.58E-10	2.69	2.25E-05		
Z4484	<i>agaZ</i>	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase (GatZ/KbaZ subunit)	NDE		5.81	2.92E-18	2.54	4.57E-04	4.24	5.68E-10	2.30	1.52E-03		
Z1396	<i>appB</i>	Cytochrome bd oxidase subunit II	NDE		NDE		3.90	6.57E-08	NDE		3.18	1.60E-05		
Z1395	<i>appC</i>	Cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I	NDE		NDE		4.33	7.02E-09	NDE		3.60	2.31E-06		
Z0070	<i>araA</i>	L-arabinose isomerase	2.79	2.22E-03	NDE		3.14	6.37E-04	2.22	1.88E-02	NDE			
Z0072	<i>araB</i>	L-ribulokinase	3.80	7.49E-05	3.49	4.33E-04	3.65	1.74E-04	3.82	7.55E-05	NDE			
Z0069	<i>araD</i>	L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase	2.81	1.03E-03	NDE		2.26	1.19E-02	NDE		NDE			
Z2954	<i>araF</i>	L-arabinose transport system (substrate-binding protein)	4.06	1.61E-05	2.69	8.44E-03	4.56	1.30E-06	4.13	1.41E-05	NDE			
Z2953	<i>araG</i>	L-arabinose transport system ATP-binding protein	2.57	6.40E-03	NDE		3.08	1.08E-03	2.09	3.18E-02	NDE			
Z5245	<i>asnA</i>	Aspartate ammonia-lyase	NDE		2.68	9.66E-04	3.11	8.23E-05	2.84	3.50E-04	3.05	1.14E-04		
Z0821	<i>asnB</i>	Asparagine synthase	NDE		2.84	2.54E-04	NDE		NDE		NDE			
Z5744	<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase	6.08	3.44E-23	5.03	8.65E-16	5.34	5.67E-18	2.84	1.33E-05	4.46	1.04E-12		
Z5734	<i>cadA</i>	Lysine decarboxylase	NDE		NDE		2.81	1.61E-03	NDE		3.33	1.21E-04		
Z5735	<i>cadB</i>	Cadaverine:lysine antiporter	NDE		NDE		3.96	2.74E-05	NDE		4.15	9.05E-06		
Z3712	<i>ccbB</i>	Ethanolamine utilization protein EutN	NDE		NDE		4.3	4.58E-04	NDE		4.47	2.33E-04		
Z0762	<i>citC</i>	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase	NDE		NDE		NDE		NDE		2.02	8.56E-03		
Z4278	<i>cmtB</i>	Mannitol-specific IIA component	2.35	4.79E-03	3.04	2.28E-04	2.10	1.38E-02	3.02	1.74E-04	2.04	1.38E-02		
Z4942	<i>dctA</i>	Aerobic C <sub>4</sub> -dicarboxylate	4.13	1.21E-09	3.91	1.73E-08	3.35	1.60E-06	3.65	1.29E-07	2.11	3.99E-03		
Z5743	<i>dctA</i>	Anaerobic C <sub>4</sub> -dicarboxylates transporter	3.21	2.46E-08	2.51	2.73E-05	2.12	5.02E-04	NDE		NDE			
Z5725	<i>dctB</i>	Anaerobic C <sub>4</sub> -dicarboxylates transporter	2.98	2.64E-05	3.49	8.54E-07	3.26	4.39E-06	NDE		2.11	4.48E-03		
Z1240	<i>dmsA</i>	Dimethyl sulfoxide reductase subunit A	3.01	3.54E-07	NDE		3.47	3.43E-09	NDE		3.07	2.25E-07		
Z1241	<i>dmsB</i>	Dimethyl sulfoxide reductase subunit B	3.48	6.54E-08	NDE		3.56	3.63E-08	NDE		2.97	6.04E-06		
Z1242	<i>dmsC</i>	Dimethyl sulfoxide reductase subunit C	2.56	3.33E-05	NDE		2.59	3.36E-05	NDE		2.29	2.76E-04		
Z3707	<i>eutA</i>	Ethanolamine utilization protein EutA	NDE		NDE		3.52	2.76E-03	2.75	2.10E-02	4.04	4.15E-04		
Z3706	<i>eutB</i>	Ethanolamine ammonia-lyase (large subunit)	NDE		NDE		3.68	1.68E-03	3.12	8.17E-03	4.02	4.60E-04		
Z3705	<i>eutC</i>	Ethanolamine ammonia-lyase (small subunit)	NDE		NDE		3.37	4.18E-03	2.79	1.85E-02	3.62	1.71E-03		
Z3711	<i>eutE</i>	Aldehyde dehydrogenase	NDE		NDE		4.14	7.46E-04	NDE		4.50	2.01E-04		
Z3709	<i>eutG</i>	Alcohol dehydrogenase	NDE		NDE		3.87	1.59E-03	NDE		4.42	2.15E-04		
Z3708	<i>eutH</i>	Ethanolamine transporter	NDE		NDE		3.42	3.79E-03	NDE		4.10	3.45E-04		
Z3714	<i>eutI</i>	Phosphotransacetylase	NDE		NDE		4.19	4.95E-04	NDE		4.51	1.43E-04		
Z3710	<i>eutJ</i>	Ethanolamine utilization protein EutJ	NDE		NDE		3.64	3.76E-03	NDE		4.25	4.99E-04		
Z3703	<i>eutK</i>	Ethanolamine utilization protein EutK	NDE		NDE		3.22	6.41E-03	3.01	1.02E-02	3.52	2.29E-03		
Z3704	<i>eutL</i>	Ethanolamine utilization protein EutL	NDE		NDE		3.28	5.36E-03	2.82	1.70E-02	3.51	2.40E-03		
Z3713	<i>eutM</i>	Ethanolamine utilization protein EutM	NDE		NDE		4.37	2.51E-04	NDE		4.64	8.61E-05		



Z5632	<i>malE</i>	Maltose/maltodextrin transport system (substrate-binding protein)	NDE	3.22	4.60E-05	NDE	2.41	3.70E-03	NDE
Z5631	<i>malF</i>	Maltose/maltodextrin transport system (permease protein)	NDE	2.71	9.82E-06	NDE	NDE	NDE	NDE
Z5630	<i>malG</i>	Maltose/maltodextrin transport system (permease protein)	NDE	2.79	3.81E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z5633	<i>malK</i>	Multiple sugar transport system (ATP-binding protein)	NDE	3.99	7.37E-08	NDE	2.36	3.38E-03	NDE
Z2860	<i>manX</i>	PTS system mannose-specific IIB component	NDE	2.69	4.64E-08	NDE	NDE	NDE	NDE
Z2861	<i>manY</i>	PTS system mannose-specific IIC component	NDE	2.81	5.05E-09	NDE	NDE	NDE	NDE
Z2862	<i>manZ</i>	PTS system mannose-specific IID component	NDE	2.66	1.49E-07	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3715	NA	Ethanolamine utilization cobalamin adenosyltransferase	NDE	NDE	3.94	1.25E-03	NDE	4.28	3.61E-04
Z4875	NA	PTS system galactitol-specific IIA component	2.44	8.99E-06	3.84	2.25E-12	2.36	6.32E-05	4.33E-11
Z4876	NA	PTS system galactitol-specific IIB component	2.98	2.87E-07	3.79	6.23E-11	2.68	1.45E-05	3.91E-09
Z4877	NA	PTS system galactitol-specific IIC component	2.22	2.94E-05	2.37	6.12E-06	NDE	NDE	NDE
Z3394	NA	MFS transporter	4.15	2.75	9.22E-03	NDE	4.54	2.57E-07	7.53E-05
Z4464	NA	L-serine dehydratase	2.86	1.51E-04	4.25	1.30E-04	NDE	3.22	4.73E-03
Z1245	NA	Putative transporter	2.75	2.35E-05	2.02	1.93E-03	NDE	2.93	1.87E-06
Z2575	NA	Tat-targeted selenite reductase subunit YnfE	2.86	2.04E-05	2.97	1.35E-05	NDE	2.68	9.54E-05
Z2577	NA	Tat-targeted selenite reductase subunit YnfG	2.75	2.04E-05	3.44	3.00E-06	NDE	2.78	2.24E-04
Z4207	NA	Xanthine dehydrogenase iron-sulfur-binding subunit	2.55	1.58E-04	2.86	2.14E-06	NDE	2.15	5.41E-04
Z2576	NA	Tat-targeted selenite reductase subunit YnfF	2.37	7.39E-06	3.31	7.19E-07	NDE	2.57	1.85E-04
Z0824	<i>nagA</i>	N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase	3.44	1.74E-07	4.49	7.20E-12	NDE	NDE	NDE
Z0825	<i>nagB</i>	Glucosamine 6-phosphate deaminase	3.31	4.52E-08	4.11	9.49E-12	NDE	2.25	3.91E-04
Z0826	<i>nagE</i>	PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIABC component	7.79	1.62E-18	5.14	2.72E-08	5.90	8.61E-11	NDE
Z4583	<i>nanaA</i>	N-acetylneuraminatase	6.32	1.03E-13	3.85	1.80E-05	5.18	2.28E-09	NDE
Z4582	<i>nanaT</i>	Sialic acid transporter	2.78	2.25E-07	2.66	1.03E-06	NDE	2.77	3.14E-07
Z3463	<i>napA</i>	Nitrate reductase (catalytic subunit)	NDE	NDE	2.35	4.67E-03	2.24	7.15E-03	NDE
Z3460	<i>napD</i>	Cytochrome v-type protein NapB	2.44	6.90E-05	2.62	2.40E-05	NDE	3.63	6.62E-10
Z3464	<i>napD</i>	Periplasmic nitrate reductase NapD	2.02	1.88E-03	2.26	4.53E-04	NDE	3.27	5.47E-08
Z3465	<i>napF</i>	Ferredoxin-type protein NapF	2.67	3.95E-04	2.93	1.28E-04	NDE	2.49	1.26E-03
Z3462	<i>napG</i>	Ferredoxin-type protein NapG	NDE	NDE	2.33	3.08E-03	NDE	2.15	6.29E-03
Z3461	<i>napH</i>	Ferredoxin-type protein NapH	NDE	NDE	4.50	1.93E-23	NDE	4.97	1.46E-28
Z2001	<i>narG</i>	Nitrate reductase ( $\alpha$ subunit)	NDE	NDE	2.97	2.34E-15	NDE	3.36	1.58E-19
Z2002	<i>narH</i>	Nitrate reductase ( $\beta$ subunit)	NDE	NDE	2.95	8.43E-11	NDE	3.30	2.02E-13
Z2004	<i>narI</i>	Nitrate reductase ( $\gamma$ subunit)	NDE	NDE	3.23	3.23E-11	NDE	3.67	2.51E-14
Z2003	<i>narJ</i>	Nitrate reductase molybdenum cofactor	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	2.06	9.01E-07
Z4726	<i>nirB</i>	Nitrite reductase (large subunit)	NDE	NDE	5.35	1.49E-13	2.63	8.52E-04	7.59E-13
Z5671	<i>nrfC</i>	Nitrite reductase (formate-dependent)	NDE	NDE	3.43	2.08E-06	NDE	3.35	3.59E-06
Z5673	<i>nrfE</i>	Cytochrome c-type biogenesis protein NrfE	NDE	NDE	3.02	1.58E-04	NDE	3.06	1.23E-04
Z5674	<i>nrfF</i>	Formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfF	NDE	NDE	2.68	4.04E-05	NDE	2.78	1.73E-05
Z5675	<i>nrfG</i>	Formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfG	3.54	2.78E-10	2.86	6.67E-07	3.44	1.30E-09	NDE
Z4758	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	2.94	2.12E-06	6.46	1.19E-04	2.32	3.81E-04	9.99E-20
Z3401	<i>preT</i>	Dihydropyrimidine dehydrogenase	2.36	8.30E-03	NDE	NDE	-2.58	4.47E-03	NDE
Z3980	<i>proW</i>	Glycine betaine/proline transport system	2.74	6.12E-04	NDE	NDE	-2.1	1.24E-02	NDE
Z3981	<i>proX</i>	Glycine betaine/proline transport system	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	2.55	4.69E-03
Z3653	<i>ptsN</i>	PTS system fructose-specific IIB-like component	6.24	4.46E-23	2.84	2.63E-05	5.80	9.53E-20	4.60
Z5250	<i>rbsA</i>	Ribose transport system ATP-binding protein	4.23	1.81E-08	2.16	9.34E-01	2.59	1.10E-03	NDE
Z5252	<i>rbsB</i>	Ribose transport system substrate-binding protein	4.23	1.81E-08	2.16	9.34E-01	2.59	1.10E-03	NDE

Z5251	<i>rbcC</i>	Ribose transport system permease protein	6.49	5.50E-29	5.18	2.95E-18	4.04	1.99E-11	6.28	1.33E-26	5.00	3.27E-17
Z5249	<i>rbsD</i>	D-ribose pyranase	6.17	2.40E-23	5.28	5.82E-17	3.40	1.91E-07	6.10	2.29E-22	4.81	3.25E-14
Z5253	<i>rbsK</i>	Ribokinase	3.82	6.03E-12	2.13	3.67E-04	NDE		2.81	9.77E-07	NDE	
Z2857	<i>sdaA</i>	L-serine dehydratase	2.18	2.59E-15	NDE	2.46	2.46	3.92E-19	2.47	4.52E-19	2.25	3.44E-16
Z4114	<i>sdaB</i>	L-serine dehydratase (deaminase)	4.36	2.42E-18	2.93	1.87E-08	NDE		NDE		NDE	
Z4113	<i>sdaC</i>	Serine transporter	4.59	1.85E-30	3.72	8.52E-20	NDE		2.39	1.43E-08	NDE	
Z0877	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	NDE		NDE		NDE		2.12	5.16E-03	NDE	
Z0878	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase (iron-sulfur subunit)	NDE		NDE		NDE		2.10	1.39E-02	NDE	
Z0876	<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase (membrane anchor subunit)	NDE		NDE		NDE		2.04	2.05E-03	NDE	
Z0880	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	NDE		NDE		NDE		2.60	6.80E-04	NDE	
Z0881	<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component	NDE		NDE		NDE		2.91	3.11E-04	NDE	
Z0882	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA synthetase ( $\beta$ subunit)	NDE		NDE		NDE		2.93	2.18E-04	NDE	
Z0883	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA synthetase ( $\alpha$ subunit)	NDE		NDE		NDE		2.89	1.78E-04	NDE	
Z5501	<i>talC</i>	Fructose 6-phosphate aldolase 2	2.45	3.24E-05	NDE	2.61	2.61	1.21E-05	NDE		2.16	3.41E-04
Z4469	<i>tdcB</i>	Threonine dehydratase	6.04	1.04E-09	NDE	6.43	6.43	7.98E-11	NDE		4.56	8.29E-06
Z4468	<i>tdcC</i>	Threonine/serine transporter	4.99	3.98E-07	NDE	5.02	5.02	3.93E-07	NDE		3.14	2.54E-03
Z4467	<i>tdcD</i>	Propionate kinase	5.22	2.18E-07	NDE	5.89	5.89	4.20E-09	2.29	3.87E-02	4.22	4.89E-05
Z4466	<i>tdcE</i>	Formate C-acetyltransferase	4.54	3.69E-05	NDE	5.05	5.05	4.69E-06	2.43	4.10E-02	3.79	8.59E-04
Z5203	<i>tnaA</i>	Tryptophanase	3.16	6.15E-03	NDE	4.73	4.73	2.43E-05	2.48	3.88E-02	3.62	1.69E-03
Z5204	<i>tnaB</i>	Low affinity tryptophan permease	NDE		NDE		3.28	2.20E-05	NDE		NDE	
Z4444	<i>uxaA</i>	Altronate hydrolase	5.41	1.05E-13	3.97	1.52E-07	NDE		NDE		NDE	
Z2184	<i>uxaB</i>	Tagaturonate reductase	4.08	9.81E-13	2.19	3.95E-04	NDE		NDE		NDE	
Z4445	<i>uxaC</i>	Glucuronate isomerase	6.19	2.40E-19	4.89	4.88E-12	NDE		NDE		NDE	
Z4990	<i>xyIA</i>	Xylose isomerase	NDE		3.45	4.67E-07	3.22	2.57E-06	4.60	3.99E-12	2.04	4.53E-03
Z4989	<i>xyIB</i>	Xylulokinase	NDE		2.02	5.33E-03	NDE		2.85	2.43E-05	NDE	
Z4991	<i>xyIF</i>	D-xylose transport system (substrate-binding protein)	NDE		4.83	3.40E-09	3.48	2.93E-05	5.77	3.03E-13	2.54	3.06E-03
Z4992	<i>xyIG</i>	D-xylose transport system (ATP-binding protein)	NDE		NDE		NDE		2.08	4.14E-03	NDE	
Z4993	<i>xyIH</i>	D-xylose transport system (permease protein)	NDE		NDE		2.03	1.36E-03	2.07	1.01E-03	NDE	
Z5717	<i>yjIE</i>	Arginine:agmatine antiporter	2.43	8.29E-03	NDE		3.76	1.94E-05	NDE		3.19	3.64E-04

NA: not assigned

NDE: not differentially expressed

#### 4. Discussion

It is well documented that *E. coli* can simultaneously metabolize several sugars and that metabolic flexibility probably provides a competitive advantage to *E. coli* in the mammalian intestine in response to variations in nutrient availability (Bertin *et al.*, 2013a; Fabich *et al.*, 2008; Ihssen *et al.*, 2005). Therefore, it is not surprising that *E. coli* activates several nutrient assimilation pathways simultaneously to assure its survival in the host GIT.

##### 4.1. Utilization of mucus-derived sugars

Mucin, the main constituent of the mammal intestinal mucus, is a filamentous glycoprotein rich in oligosaccharides (Deplancke & Gaskins, 2001). Mucus is constantly released in the GIT lumen and degraded by several commensal bacteria which breakdown mucin into sugars and nitrogen components (Ottman *et al.*, 2017). Therefore, mucus-derived carbohydrates constitute an important carbon source constantly renewed and available in intestinal contents. In the bovine intestine, the six main fermentable monosaccharides constituting the mucin are galactose, GlcNAc, GalNAc, fucose, mannose and Neu5Ac (Montagne *et al.*, 2000). These carbohydrates were previously found to be present in the bovine small intestine at concentrations ranging from 0.5 to 1.5 mM, except Neu5Ac which was in much lower concentration (Bertin *et al.*, 2013a). EHEC was shown to be able to assimilate these mucus-derived carbohydrates in the bovine small intestine (Bertin *et al.*, 2013a). Importantly, mannose, GlcNAc, Neu5Ac and galactose conferred a competitive growth advantage to EHEC in this gut compartment (Bertin *et al.*, 2013a). However, the possible utilization of these mucus-derived carbohydrates in the other bovine digestive compartments had not been documented yet. In this study, we showed that transport and/or assimilation of five of the six mucus-derived carbohydrates (GalNAc, Neu5Ac, GlcNAc, galactose and fucose) were over-expressed during incubation in posterior bovine DC (small intestine and rectum). In addition, genes encoding mannose PTS were over-expressed in rectum. The rate of renewal and the thickness of the mucus layer varies for different regions of the gut, and it was previously shown that the nitrogen and organic matter content of bovine mucus was different in ileum and colon (Aperce *et al.*, 2014). It is thus not surprising to find differences in the utilization of mucus-derived sugars by EHEC in the different parts of the GIT.

Survival of *E. coli* in the stationary growth phase depends on nutrients that are still available after the rapid growth of the bacteria during the exponential growth phase. Therefore, as we analyzed gene transcription patterns in both exponential and stationary growth phases in small intestine and rectum contents, we could propose a sequential utilization of the mucus-derived carbohydrates by EHEC. We suggest that galactose, mannose and GlcNAc are rapidly assimilated by the bacteria in both posterior DC, and are exhausted when the bacteria reached the stationary growth phase. In contrast, fucose and Neu5Ac would be used as carbon source up to the stationary growth phase whereas GalNAc would be used in a second step when galactose, mannose and GlcNAc are exhausted. Interestingly, the genes encoding PTS for mannose uptake were over-expressed by EHEC EDL933 in the exponential growth phase, but not in the stationary growth phase in rectum content, suggesting that the bacteria needed to rapidly assimilate mannose to colonize this site. Taken together, our results strongly suggested that mucus-derived carbohydrates are important carbon sources for the survival of EHEC all along the bovine intestine.

Interestingly, the bovine rectum is a major site for EHEC colonization and fucose has been described as a critical carbon source for the maintenance of EHEC at this site (Snider *et al.*, 2009). Fucose transport is encoded by the *fuc* genes, and is finely regulated by the two-component system FusKR



which contribute also to the regulation of LEE genes expression (Pacheco *et al.*, 2012). In the present work, many genes from the fucose operon were up-regulated in both small intestine and rectum contents, suggesting that fucose might be important for EHEC maintenance all along the lower gut. However, the *fusKR* genes were not differentially expressed in gut contents compared to M9-Glc minimal medium. The regulation of the *fuc* operon under our experimental conditions needs further studies.

#### 4.2. Other carbohydrates

Additional carbohydrates can be assimilated by EHEC in the mammal intestine. For example, arabinose, hexuronate and ribose are used by EHEC EDL933 to colonize streptomycin-treated mice (Fabich *et al.*, 2008). These carbohydrates may originate from other host derived glycans such as glycocalyx of epithelial cells (Moran *et al.*, 2011), from prokaryotic and eukaryotic lysed cell components, or may be released from the degradation of dietary polysaccharides by the endogenous microbiota. The concentration of free mono- and di-saccharides is generally low in the rumen of cattle because the rumen microbiota is very efficient in using these substrates (Bertin *et al.*, 2017; McSweeney & Mackie, 2012). However, EHEC EDL933 induced catabolic pathways for xylose, ribose, mannitol and galactitol during incubation in rumen content, suggesting that these sugars might be available at this site. These pathways were also up-regulated in small intestine and rectum contents. Ribose is one of the most preferred sugars used by *E. coli* and the catabolism of xylose and ribose allows the synthesis of precursors constituting important substrates for the pentose phosphate pathway (Chang *et al.*, 2004; Fabich *et al.*, 2008). In addition, the transcription of the genes encoding the transport and/or assimilation of arabinose, fructose and hexuronates (glucuronate and galacturonate) was also induced in EHEC incubated in posterior digestive contents (small intestine and rectum).

Interestingly, EHEC only induced genes encoding maltose uptake and phosphorylation of gluconate in rectum contents suggesting that the bacteria would specifically require these two carbohydrates to colonize the rectum or that the two carbohydrates are only available at this site. Maltose was previously found to play an important role in O157:H7 EDL933 mice colonization and the utilization of maltose gave the pathogen a competitive advantage during the initiation stage of colonization when competing with commensal *E. coli* (Jones *et al.*, 2008). Also, gluconate is metabolized by *E. coli* in the mice intestine (Leatham *et al.*, 2009), and its distribution in the drinking water of mice was shown to impact colonization by EDL933 (Jones *et al.*, 2008). Noteworthy, gluconate transport and utilization was also induced by the probiotic bacterium *Propionibacterium freudenreichii* in colonic environment *in vivo* compared with artificial medium *in vitro* (Saraoui *et al.*, 2013). Gluconic acid is present in plant products, but also in intestinal mucus (Chang *et al.*, 2004; Saraoui *et al.*, 2013). It might then be found by EHEC in the cow rectum content. Maltose can also have a dietary origin and be generated through the degradation of starch present in the bovine ration by the microbiota. However, in the bovine rectum, it might rather be provided by lysed cells releasing their endogenous glycogen. Indeed, glycogen storage is widespread in gut microbiota because it represents a useful strategy for rapid growth in a very competitive ecosystem (Jones *et al.*, 2008; Matheron *et al.*, 1998). The concentration of mucus-derived carbohydrates has been quantified in bovine small intestine (Bertin *et al.*, 2013a; Montagne *et al.*, 2000), but their relative concentration may vary according to the GIT compartment as regional specific glycosylation could occur (Moran *et al.*, 2011; Snider *et al.*, 2009). Thus, it will be interesting to analyze the composition and concentration of sugars from mucosal and other origins in rectum and rumen compartments, in order to better comprehend the

sugar utilization by EHEC EDL933 all along the GIT. It would also be important to study the affinity of the strain for these carbohydrates.

#### 4.3. Gluconeogenic substrates

The GNG pathway contributes to bacterial fitness *in vivo* and utilization of gluconeogenic substrates is required for a maximal colonization of the mouse intestine by EHEC (Miranda *et al.*, 2004). Noteworthy, GNG is an important pathway for maintaining EHEC in the bovine small intestine (Bertin *et al.*, 2014). Indeed, work from our laboratory previously showed that in the bovine small intestine, EHEC EDL933 used preferentially mucus sugars for growth and then when sugars were exhausted, they used gluconeogenic substrates (Bertin *et al.*, 2014). Free amino acids such as aspartate and serine as well as glycerol were described as gluconeogenic substrates in small intestine content (Bertin *et al.*, 2014). The present work shows that aspartate and serine were also used in rumen and rectum contents as genes encoding their transport and metabolism were activated in these compartments. These amino acids are important constituents of bovine mucin, which contains a high concentration of glutamic and aspartic acids, threonine, and serine (Montagne *et al.*, 2000). Serine is also part of phospholipids constituting eukaryotic and prokaryotic cell membranes. Thus, free amino acids present in the bovine intestinal contents could constitute important carbon and nitrogen sources to EHEC EDL933 (Bertin *et al.*, 2014). A significant up-regulation was also observed for the genes involved in glycerol and G3P transport and catabolism, suggesting that glycerol may also be a gluconeogenic substrate used by EHEC EDL933 all along the GIT. Genes encoding anaerobic antiporting of succinate against aspartate and fumarate were also over-expressed in the three DC. In small intestine contents, succinate was produced during incubation of EDL933, suggesting anaerobic antiporting (DcuB) of external aspartate against succinate.

#### 4.4 Ethanolamine

Ethanolamine (EA) is included in phosphatidylethanolamine, the most abundant phospholipid in eukaryotic and prokaryotic cell membranes. Free EA was detected in bovine small intestine and was shown to be used as a nitrogen source by EHEC (Bertin *et al.*, 2011). Furthermore, EA, constantly released in the intestine conferred a nutritional advantage to EHEC and participated to the survival of the pathogen in the bovine intestine (Bertin *et al.*, 2011). In this study, we showed that in addition to small intestine, the *eut* genes were up-regulated in EHEC incubated in rumen but only half of them in rectum contents, suggesting that EA is weakly present in rectum contents. In a previous study we showed that the concentration of free EA was much more important in bovine small intestine (2.2 mM) than in rumen (7.7 nM) or colon (17.3 nM) contents (Bertin *et al.*, 2011). The weak concentration of EA in rumen contents strongly suggested that EA probably cannot promote EHEC growth in the rumen of cattle. However, Kendall *et al.* (2012) showed that EA can play complex roles in metabolism, cell-to-cell signaling, and virulence. In fact, EA, under low concentrations, is a signal for gene regulation, independent of metabolism (Kendall *et al.*, 2012). While the specific mechanisms of EA gene regulation remain to be completely elucidated, we suggest that EA metabolism is involved in a positive regulation of genes involved in EHEC survival during its passage through the rumen. Further studies will be necessary to elucidate the precise role of EA in the rumen of cattle.

#### 4.5. Respiration

The present study showed that several anaerobic respiratory systems were up-regulated in EHEC EDL933 incubated in DC compared to M9-Glc, but some genes encoding proteins involved in aerobic

respiration appeared also over-expressed. Microaerobic niche appeared to be critical for EHEC colonization in the mammalian intestine since utilization of oxygen was necessary for colonization of streptomycin-treated mouse intestine by EDL933 (Jones *et al.*, 2007). When oxygen became limited, nitrate was the preferred terminal electron acceptor and the nitrate respiration pathway was also required for EHEC ED933 colonization of the mouse intestine (Jones *et al.*, 2007). Under our conditions, genes encoding subunits of the nitrate reductases were significantly up-regulated in the three DC, suggesting that nitrate respiration is used by EHEC during its transit through the bovine GIT. Fumarate constitutes the terminal electron acceptor of fumarate respiration, when oxygen is absent and low level of nitrate is available (Unden & Bongaerts, 1997; Unden *et al.*, 2016). We observed that fumarate reductase genes were highly over-expressed by EHEC EDL933 in all the tested digestive compartments, suggesting that, as for the mouse intestine (Jones *et al.*, 2007), fumarate respiration is important for survival and multiplication in the bovine GIT.

Surprisingly, genes encoding proteins involved in aerobic respiration appeared also up-regulated such as cytochrome oxidase in small intestine and rumen contents or succinate dehydrogenase in rectum content. The use of aerobic respiration is not surprising in small intestine content because the incubation of EDL933 was performed under limited-oxygen conditions and not anaerobiosis. These experimental conditions were chosen to better mimic the physiological conditions as oxygen concentration in the small intestine is higher than in the other parts of the lower gut or in the rumen (Espey, 2013; Jones *et al.*, 2007). Indeed, we observed a higher growth rate of EDL933 in the small intestine content compared with the other DC (caecum, colon and rectum). In this compartment, EDL933 had probably more access to oxygen and used it, at least partly, as terminal electron acceptor. Finally, our results suggest that EDL933 was both dependent on aerobic and anaerobic respiration for survival and growth in the bovine GIT contents.

## Conclusion

In the present work, we showed that EHEC EDL933 probably use several respiratory pathways to produce energy as well as a variety of carbon and nitrogen sources, most of them from animal origin, to survive in rumen, and grow in small intestine and rectum contents. EHEC EDL933 showed a high plasticity in the utilization of sugars and sugar derivatives as well as in its respiratory metabolism. Importantly, our results also highlighted that EDL933 specifically over-expressed several genes in the rectum content, such as genes involved in the transport and metabolism of mannose and maltose. The bovine rectum is considered as a major site for EHEC colonization and multiplication. Therefore, our results could help to find new strategies designed to specifically reduce intestinal nutrient availability to *E. coli* O157:H7. To this end, administration to ruminants of probiotics very efficient in the utilization of EHEC preferred nutrients may be an effective pre-harvest strategy to lower EHEC carriage and shedding by cattle.

## Competing interests

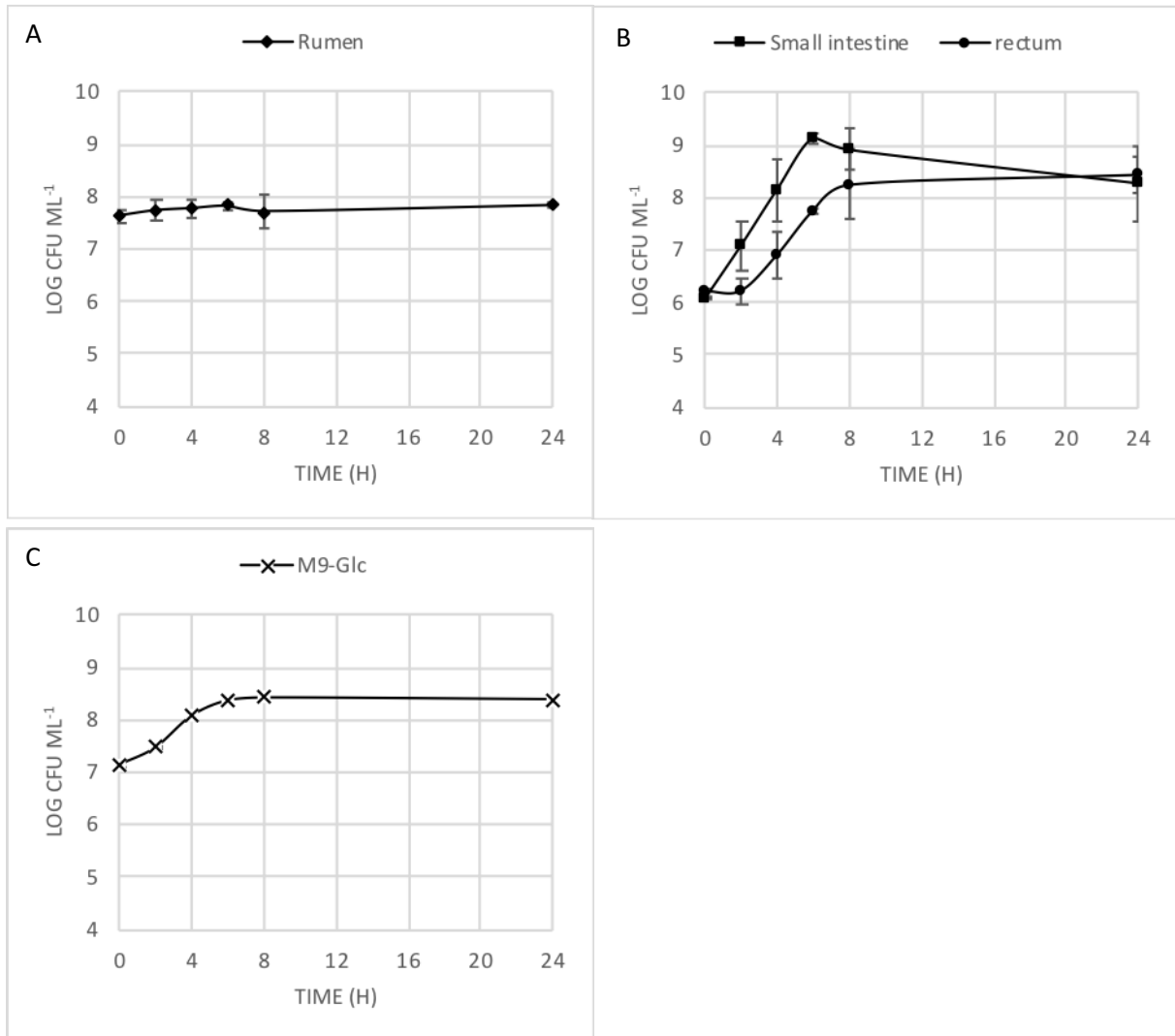
The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors thank Laura Quentin for excellent technical assistance. The sequencing was performed in collaboration with the GeT core facility, Toulouse, France (<http://get.genotoul.fr>), which was supported by France Genomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). We are also

grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrénées (Genotoul Bioinfo) for providing computing and storage resources.

Supplementary Material



**Fig. S1 Growth curves of EDL933 incubated in filtered digestive contents and M9-Glc minimal medium with glucose as the sole carbon source.** Bacterial concentrations were adjusted for RNA extraction experiments. Incubations were performed at 39°C in conditions described in the Materials and Methods section. **A.** Rumen contents, **B.** Small intestine and rectum contents, **C.** M9-Glc

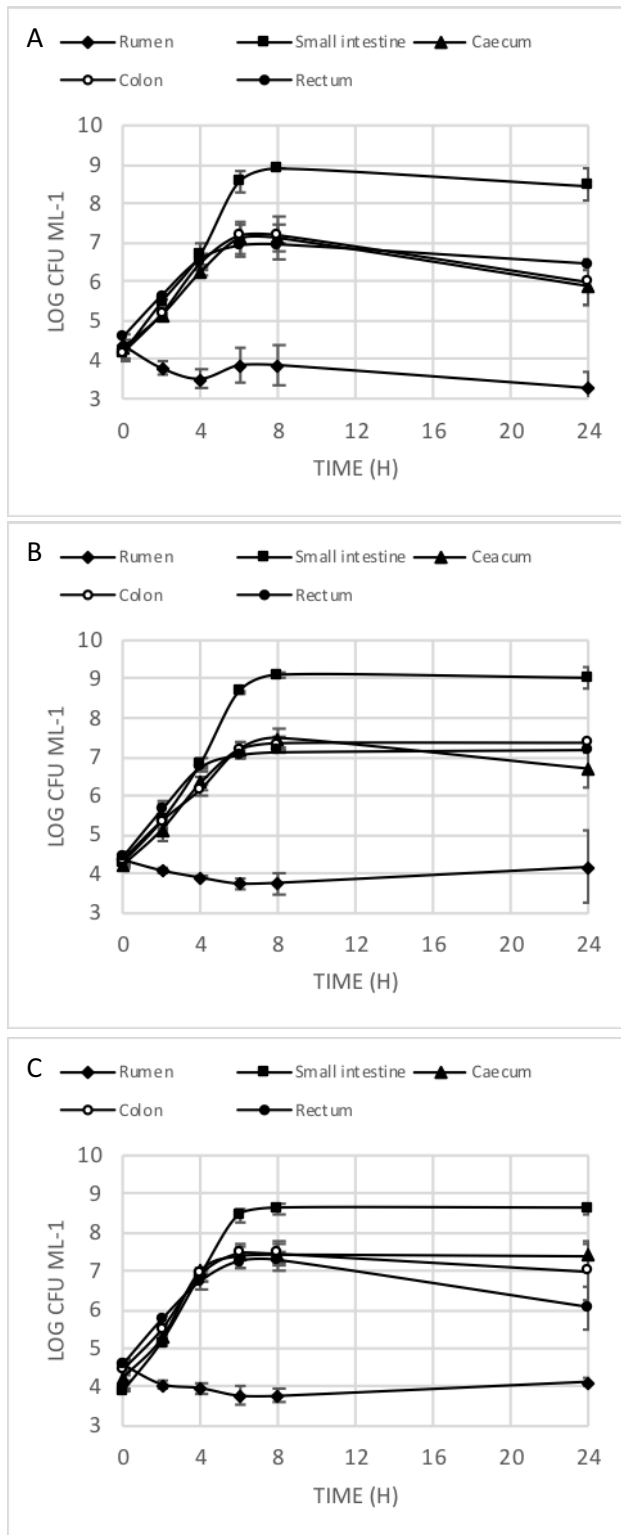
**Table S1 RNA-seq mapping assessment**

RNA-seq Sample ID	Digestive contents Growth phase	Total reads generated	Reads after trimming	Mapped reads to EDL933 genome (% mapped)
EDL933_1	Rumen	42,939,146	42,923,152	42,672,416 (99.42)
EDL933_2		34,986,450	34,979,296	34,867,530 (99.68)
EDL933_3		28,030,862	28,025,264	27,963,762 (99.78)
EDL933_4	Small intestine Exponential	37,901,152	37,893,572	37,733,656 (99.58)
EDL933_5		34,565,456	34,553,404	34,471,754 (99.76)
EDL933_6		30,448,202	30,441,850	30,343,730 (99.68)
EDL933_7	Small intestine Early stationary	34,095,408	30,088,580	33,990,068 (99.71)
EDL933_8		16,921,418	16,913,888	16,888,432 (99.85)
EDL933_9		35,578,220	35,295,296	35,143,248 (98.57)
EDL933_10	Rectum Exponential	31,104,402	31,036,286	30,924,190 (99.64)
EDL933_11		18,983,622	18,557,648	18,464,044 (97.50)
EDL933_12		15,122,874	14,782,904	14,685,124 (97.34)
EDL933_13	Rectum Early stationary	14,311,528	14,089,908	14,028,484 (98.56)
EDL933_14		11,285,778	11,096,106	11,039,860 (97.49)
EDL933_15		31,898,954	31,870,332	31,760,648 (99.66)
EDL933_16	M9-Glc Exponential	35,645,614	35,630,108	35,510,990 (99.67)
EDL933_17		35,761,134	35,751,146	35,547,424 (99.43)
EDL933_18		21,499,258	21,494,146	21,404,684 (99.58)
EDL933_19	M9-Glc Early stationary	23,011,282	23,006,292	22,933,804 (99.68)
EDL933_20		21,878,430	21,873,106	21,802,224 (99.68)
EDL933_21		121,921,678	121,874,896	121,457,454 (99.66)
<b>Total</b>		<b>677,890,868</b>	<b>676,177,170</b>	<b>673,633,526</b>

Table S2 Primers used for RT-qPCR

Gene tag	Gene	Forward	Reverse	Reference
Z4488	<i>agaF</i>	TTTATCGCCATCGATTTTCC	CAGCACCATCTCCAGTAGCA	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z0070	<i>araA</i>	GAAACAGCTTCTGGTCTGG	GGTCATTGCCTTTCTCGAAG	This study
Z5245	<i>asnA</i>	AACCGCTTACATTGCCAAAC	CACAGCCCGACAAGTTATCC	This study
Z5744	<i>aspA</i>	CTTGCTCTTCTGGTCCA	AACATAGCCTGGCCAATGAC	Bertin <i>et al.</i> , 2014
Z4942	<i>dctA</i>	GTGGTCTGGTATTGGGTTC	GAGTAGCCTGTCGGGATGAC	Bertin <i>et al.</i> , 2014
Z5743	<i>dcuA</i>	CTGGTTGAAAAACCGCTGAT	TCGATGTTGTTGGAAACGAA	This study
Z5725	<i>dcuB</i>	GCCATCTTGAGTTCTCTCGAC	ACTCACGGTTTTTTCGGTACG	This study
Z3706	<i>eutB</i>	GTGCGGGCTTAGAAGATCAC	GAATGCGGTGGTCTGGTAGT	Bertin <i>et al.</i> , 2011
Z2236	<i>fdnG</i>	CGATATCCCTGACTTCGGC	TTGTTACATACAGACGAACCAC	This study
Z5762	<i>frdA</i>	CGGTATCCTGATGACCGAAG	GTGGAGATGGTGTGCCTTT	This study
Z3425	<i>fruA</i>	GCCATGCGAAACCTTACACT	CACGGGTTTCAACTTTCACC	This study
Z4117	<i>fucA</i>	AGGATGGGATGCTGATTACG	CGGTCCGGTTAAGAATGGAAA	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z2615	<i>fumA</i>	AGTGAATACCGGCACCAATC	GCGTCAGTAACGCTTTGGTT	This study
Z0927	<i>galk</i>	AGTTCTTCCGCTTCACTGGA	GAGCGACAGTCAATCAGCAA	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z3499	<i>glpA</i>	TGAAGTGCAGTACGCGGTAG	CCTTTCCAGCGTTCGTTAAG	This study
Z4786	<i>glpD</i>	CATCAATGGTCTGGTATCG	TTCAGCAGCACTTACGTTTC	This study
Z5472	<i>glpF</i>	TACCATTGCATTGTGGCT	AAAGTGCCTGCCAGATCAAC	This study
Z5471	<i>glpK</i>	GGGTAGAACACGACCCAATG	ATAGGCTTGCCGGTTTCTTT	This study
Z3498	<i>glpT</i>	TAACGAAAAAGCGGAACAGG	AAGAAGTAGGCCAGGAGGA	This study
Z4805	<i>gntK</i>	TTCTTGATGGCGATTTCTCTC	TACCTTACGCAGCAAGTCA	This study
Z1390	<i>hyaB</i>	GGCGTTCTGTTAACGTATCT	CATCCAACACATCGATCCAG	This study
Z2616	<i>manA</i>	CTGTTCTCTCCGCTGTTGCT	TGGCTTCGAACTTACATTG	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z4595	<i>mdh</i>	GGAAGTGAAGGCAACAGC	GCGTTCTGGATACGTTTGGT	This study
Z4875	NA	GAACAGATCATCCGCCAGTT	CATGTTTATGGTCCCGTGTGC	This study
Z0826	<i>nagE</i>	CAGGTTCTGACGAAGCATT	CTTTACCTTCCAGCGCTACG	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z4583	<i>nanA</i>	CCGTCACGCCGTTCTACTAT	GATCGCCAGAGGTCTGTTTC	Bertin <i>et al.</i> , 2013
Z3463	<i>napA</i>	ACGGTAAAGACCGTTTGACG	CGGCATAACCTTCCAGATA	This study
Z2001	<i>narG</i>	GAAGGCGCTGCATAGCGATC	CGAGAAACCAGCAACACGG	This study
Z2244	<i>narZ</i>	CCTCAAACAACACAGCGATC	CGAGAAACCAGCAACGCGA	This study
Z5671	<i>nrfC</i>	GTCGTTATGCATCGGCTGTA	CAGTGCTGGCAAGACTTACG	This study
Z4758	<i>pckA</i>	GTACGCAGAAGTGTGGTGA	GGCAGAGTGAAGGTTTCTGC	This study
Z5250	<i>rbsA</i>	GAAATTCTTGGCGTCTCTGG	GCCCAACACTAAACCGTCAC	This study
Z2857	<i>sdaA</i>	ATGCTGGTTTCCAGCGATAA	TATAGATGTCCGGGCTGACC	This study
Z0877	<i>sdhA</i>	GGGTCGGACTATATCGGTGA	GCCGAAGTTTTTTCGACTGAC	This study
Z0882	<i>sucC</i>	GACCTGATCGCTGACGGTAT	CTGCATCCGTCAGACCTTTT	This study
Z4467	<i>tdcD</i>	GGAAGGCTTGATGATGGGTA	GCAATTCGGTGAACAAAGGT	Bertin <i>et al.</i> , 2014
Z5203	<i>tnaA</i>	TACACCATTCCGACTCACCA	CCGTATCGAAGGCTTCTT	This study
Z4991	<i>xyfF</i>	GCGCTAACCGCCAATAATAA	CCGGCAGCAATACGTTAAT	This study

NA: not assigned



**Fig. S2 Growth curves of different *E. coli* strains incubated in unfiltered bovine digestive contents.**

**A.** O157:H7 EHEC strain Sakai Rif<sup>R</sup>, **B.** O157:H7 STEC strain NV95 Rif<sup>R</sup>, **C.** Bovine commensal *E. coli* strain BG1 Rif<sup>R</sup>

**Table S3 Quantification by RT-qPCR of expression of selected genes in EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents relative to M9-Glc**

Gene Tag	Gene	Exponential growth phase			Stationary growth phase			Rumen			
		Small intestine		Rectum		Small intestine			Rectum		
		Log2FC	p-value <sup>d</sup>	Log2FC	p-value <sup>d</sup>	Log2FC	p-value <sup>d</sup>		Log2FC	p-value <sup>d</sup>	
Z4488	<i>agaF</i>	0.19	0.7976	2.68*	0.0413	1.55	0.0423	2.67	0.0204	2.95	0.0060
Z0070	<i>araA</i>	1.92	0.0628	1.98	0.0338	2.00	0.0258	2.23	0.0189	2.94	0.0066
Z5245	<i>asnA</i>	-0.83	0.2554	3.37*	0.0263	3.80	0.0056	2.53	0.0004	2.63	0.0095
Z5744	<i>aspA</i>	5.96	0.0002	5.08	< 0.0001	5.44 <sup>a</sup>	0.0019	1.92 <sup>b</sup>	0.0113	4.59 <sup>a</sup>	0.0008
Z4942	<i>dctA</i>	3.22	0.0059	3.06	0.0034	2.28	0.0035	2.20	0.0033	2.42	0.0006
Z5743	<i>dcuA</i>	1.90	0.0017	1.98	0.0003	2.96	0.0016	0.48	0.4782	3.02	0.0027
Z5725	<i>dcuB</i>	1.08	0.0793	3.21*	< 0.0001	2.87	0.0266	2.23	0.0282	3.10	0.0013
Z3706	<i>eutB</i>	0.68	0.1406	2.24*	0.0009	5.11 <sup>b</sup>	< 0.0001	3.68 <sup>ab</sup>	0.0032	2.01 <sup>a</sup>	0.0001
Z2236	<i>fdnG</i>	1.94	0.1353	1.44	0.0113	1.08 <sup>b</sup>	0.0100	1.81 <sup>ab</sup>	0.0003	2.73 <sup>a</sup>	< 0.0001
Z5762	<i>frdA</i>	2.92	0.0016	2.27	0.0002	3.71 <sup>a</sup>	0.0014	1.91 <sup>b</sup>	0.0049	4.64 <sup>c</sup>	< 0.0001
Z3425	<i>fruA</i>	1.54	0.1903	2.46	0.0076	1.68	0.0310	0.76	0.0472	1.75	0.0175
Z4117	<i>fucA</i>	1.70	0.0649	2.44*	0.0047	1.10 <sup>b</sup>	0.0049	3.05 <sup>a</sup>	0.0478	2.61 <sup>a</sup>	0.0010
Z2615	<i>fumA</i>	2.63	0.0002	3.12	0.0010	2.06 <sup>a</sup>	0.0217	2.68 <sup>a</sup>	0.0008	3.92 <sup>b</sup>	0.0047
Z0927	<i>galK</i>	-0.05	0.8888	1.22	0.0969	0.32	0.6222	-0.76	0.3707	0.32	0.6691
Z3499	<i>glpA</i>	2.28	0.0141	1.10	0.0037	5.61	< 0.0001	1.84	0.0002	2.14	0.0004
Z4786	<i>glpD</i>	3.31	0.0095	2.11	0.0381	6.28 <sup>a</sup>	0.0006	4.53 <sup>b</sup>	0.0002	3.31 <sup>c</sup>	0.0033
Z5472	<i>glpF</i>	2.20	0.0414	2.67	0.0021	3.42	< 0.0001	4.01	0.0004	2.92	0.0007
Z3498	<i>glpT</i>	4.69	0.0019	2.99	0.0011	4.86	0.0366	3.29	0.0030	3.29	0.0143
Z4805	<i>gntK</i>	-1.10	0.5351	0.32	0.6226	1.74	0.0425	1.43	0.0510	2.83	0.0117
Z1390	<i>hyaB</i>	4.00	0.0021	6.34	0.0008	6.45 <sup>a</sup>	< 0.0001	2.16 <sup>b</sup>	0.0015	5.46 <sup>a</sup>	< 0.0001
Z4875	NA	0.96	0.0329	2.28	0.0023	2.28 <sup>a</sup>	0.0001	1.66 <sup>a</sup>	0.0035	3.61 <sup>b</sup>	< 0.0001
Z0826	<i>nagE</i>	2.63	0.0170	4.69	< 0.0001	1.36	0.0138	1.41	0.0510	1.89	0.0054
Z4583	<i>nanA</i>	7.13*	0.0008	4.12	0.0005	2.96	0.0254	5.67	0.0011	3.23	0.0030
Z3463	<i>napA</i>	0.63	0.3426	2.10	0.0733	1.48	0.0473	2.14	0.0469	2.77	0.0139
Z2001	<i>narG</i>	-0.57	0.4439	1.69	0.1563	2.80 <sup>ab</sup>	0.0027	1.22 <sup>b</sup>	0.1190	4.77 <sup>a</sup>	0.0007
Z4758	<i>pckA</i>	2.74	0.0007	2.01	0.0067	3.26	0.0003	2.82	0.0038	2.37	0.0024
Z5250	<i>rbsA</i>	3.04	0.0049	3.63	0.0009	2.54	0.0022	3.13	0.0003	3.80	0.0044
Z2857	<i>sdaA</i>	1.06	0.0723	1.09	0.0028	1.95	0.0058	2.05	0.0122	2.78	0.0029
Z0877	<i>sdhA</i>	-0.22	0.7970	0.85	0.1199	0.76 <sup>ab</sup>	0.0070	1.75 <sup>b</sup>	0.0112	-0.25 <sup>a</sup>	0.5901
Z0882	<i>sucC</i>	-0.50	0.4966	-0.64	0.2931	1.70 <sup>ab</sup>	0.0008	2.37 <sup>b</sup>	0.0012	0.37 <sup>a</sup>	0.3041
Z4467	<i>tdcD</i>	2.63	0.0329	2.19	0.0023	3.85	< 0.0001	3.31	0.0282	2.59	0.0003
Z5203	<i>tnaA</i>	1.77	0.0133	2.44	0.0056	4.38	0.0010	2.51	0.0251	2.63	0.0004

\* Log2FC was significantly different between small intestine and rectum contents during the exponential growth phase (Student t-test,  $p < 0.05$ )

<sup>a, b, c</sup> Log2FC was significantly different between intestinal contents during the early stationary growth phase (One-way ANOVA with the Tukey post-hoc test,  $p < 0.05$ )

<sup>d</sup>  $p$ -value was determined by a student t-test comparing the level of gene expression observed between intestinal contents and M9-Glc minimal medium.  $p < 0.05$  was considered as significantly different.



**Table S4 COG classification of differentially expressed genes ( $\log_2FC > |2|$ ) in EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents during each growth phases compared to M9-Glc minimal medium**

COG	Fonction	Number of gene	% number of gene
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	54	1.8
K	Transcription	176	5.7
L	Replication, recombination and repair	23	0.7
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2	0.1
V	Defense mechanisms	39	1.3
T	Signal transduction mechanisms	145	4.7
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	107	3.5
N	Cell motility	91	3.0
W	Extracellular structures	15	0.5
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	36	1.2
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	104	3.4
X	Mobilome: prophages, transposons	17	0.6
C	Energy production and conversion	321	10.4
G	Carbohydrate transport and metabolism	333	10.8
E	Amino acid transport and metabolism	467	15.1
F	Nucleotide transport and metabolism	83	2.7
H	Coenzyme transport and metabolism	138	4.5
I	Lipid transport and metabolism	55	1.8
P	Inorganic ion transport and metabolism	318	10.3
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	65	2.1
R	General function prediction only	194	6.3
NA	Unknown, unclassified	705	22.9

NA: not assigned

**Table S5 COG classification of up-regulated genes in EHEC EDL933 incubated in filtered rumen, small intestine and rectum contents during the early stationary growth phase with a log2FC > 2 compared to M9-Glc**

Gene tag	Gene	Gene product
<b>C: Energy production and conversion</b>		
Z2315	<i>acpD</i>	FMN-dependent NADH-azoreductase
Z4942	<i>dctA</i>	Aerobic C <sub>4</sub> -dicarboxylate transporter
Z3703	<i>eutK</i>	Ethanolamine utilization (EutK protein)
Z2236	<i>fdnG</i>	Formate dehydrogenase (α subunit)
Z5435	<i>fdoH</i>	Formate dehydrogenase (iron-sulfur subunit)
Z5434	<i>fdoI</i>	Formate dehydrogenase (γ subunit)
Z5762	<i>frdA</i>	Fumarate reductase (flavoprotein subunit)
Z4116	<i>fucO</i>	Lactaldehyde reductase
Z2615	<i>fumA</i>	Fumarase
Z3499	<i>glpA</i>	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (a subunit)
Z4786	<i>glpD</i>	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase
Z5471	<i>glpK</i>	Glycerol kinase
Z1389	<i>hyaA</i>	Hydrogenase I (small subunit)
Z1390	<i>hyaB</i>	Hydrogenase I (large subunit)
Z1391	<i>hyaC</i>	Hydrogenase I (B-type cytochrome subunit)
Z1392	<i>hyaD</i>	Hydrogenase 1 (maturation protease)
Z2668	<i>nemaA</i>	N-ethylmaleimide reductase
Z5671	<i>nrfC</i>	Nitrite reductase (formate-dependent)
Z4467	<i>tdcD</i>	Propionate kinase
Z4466	<i>tdcE</i>	Formate acetyltransferase
<b>G: Carbohydrate transport and metabolism</b>		
Z4487	<i>agaE</i>	PTS N-acetylgalactosamine transporter (IID subunit)
Z4485	<i>agaV</i>	PTS N-acetylgalactosamine transporter (IIB subunit)
Z4486	<i>agaW</i>	PTS N-acetylgalactosamine transporter (IIC subunit)
Z4491	<i>agaY</i>	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (GatY subunit)
Z4484	<i>agaZ</i>	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (GatZ subunit)
Z4278	<i>cmtB</i>	Mannitol-specific IIA component
Z4117	<i>fucA</i>	L-fuculose-phosphate aldolase
Z5472	<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein
Z3498	<i>glpT</i>	Glycerol 3-phosphate transporter
Z4875	NA	Galactitol-specific IIA component
Z4876	NA	Galactitol-specific IIB component
Z4879	NA	Phosphocarrier protein
Z3394	NA	MFS transporter
Z5250	<i>rbsA</i>	Ribose transport system ATP-binding protein
Z5251	<i>rbsC</i>	Ribose transport system permease protein
Z5249	<i>rbsD</i>	D-Ribose pyranase
Z4990	<i>xylA</i>	Xylose isomerase
Z4991	<i>xylF</i>	Xylose transport system substrate-binding protein
Z2813	<i>ydjK</i>	MFS transporter
Z3431	<i>yeiQ</i>	Putative oxidoreductase
<b>E: Amino acid transport and metabolism</b>		
Z5245	<i>asnA</i>	Aspartate ammonia-ligase
Z5744	<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase
Z3707	<i>eutA</i>	Ethanolamine utilization (EutA protein)
Z3706	<i>eutB</i>	Ethanolamine ammonia-lyase (large subunit)
Z3705	<i>eutC</i>	Ethanolamine ammonia-lyase (small subunit)
Z3704	<i>eutL</i>	Ethanolamine utilization (EutL protein)
Z3717	<i>eutP</i>	Ethanolamine utilization (EutP protein)
Z3718	<i>eutS</i>	Ethanolamine utilization (EutS protein)
Z3500	<i>glpB</i>	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (b subunit)
Z3401	<i>preT</i>	Dihydropyrimidine dehydrogenase (PreT subunit)
Z2857	<i>sdaA</i>	L-serine dehydratase
Z5203	<i>tnaA</i>	Tryptophanase

NA: not assigned

### I.3. Résultats complémentaires

Une analyse préliminaire des gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion, la virulence et dans la résistance aux stress des EHEC a été réalisée en s'appuyant sur les données obtenues par RNA-Seq. La classification des gènes sur-exprimés en COG, comme précédemment effectuée, n'a pas permis de grouper les gènes dans des catégories fonctionnelles spécifiques puisque ces dernières n'existent pas. L'expression des gènes codant des facteurs d'adhésion et de virulence et des systèmes de résistance à différents stress, ont été analysés, de manière globale, lors de l'incubation de la souche (i) en contenu de rumen (6 heures de culture) et (ii) en contenus d'intestin grêle et de rectum au cours des phases exponentielle et stationnaire de croissance (3 heures et 6 heures de culture, respectivement). Cette analyse a permis d'identifier des mécanismes mis en place par les EHEC pour persister dans le tractus gastro-intestinal du bovin.

#### I.3.1. Expression de gènes codant des facteurs d'adhésion et de virulence

##### I.3.1.1 Dans les contenus de rumen

La souche EDL933 a induit la transcription du gène *flhC*, codant un activateur transcriptionnel de la biosynthèse du flagelle, et le gène *acfC*, codant un facteur d'adhésion (Tableau 1). Le gène *acfC* (« accessory colonization factor » chez *Vibrio cholerae*) ou *paa* (« porcine A/E associated adhesin » chez *E. coli*) est porté par les « O Islands » O157 et Sp9 des souches EHEC EDL933 et Sakai, respectivement (Batisson *et al.*, 2003).

**Tableau 1 : Gènes sur-exprimés par EDL933 en contenus de rumen impliqués dans l'adhésion en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log<sub>2</sub>FC > 2)**

Numéro	Gène	Produit du gène	Log <sub>2</sub> FC	q-value
Z2053	<i>acfC</i>	Facteur de colonisation accessoire	2,4	6,01E-03
Z2945	<i>flhC</i>	Activateur transcriptionnel du flagelle	2,0	1,07E-04

##### I.3.1.2. Dans les contenus d'intestin grêle

La souche EHEC EDL933 a induit l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la formation de flagelles (Tableau 2). Ces gènes étaient plus nombreux en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance. En phase exponentielle de croissance, un nombre important de gènes de l'opéron *flg*, permettant la formation du corps basal et du crochet du flagelle, étaient sur-exprimés alors que leur transcription n'était pas altérée en phase stationnaire, suggérant une synthèse de flagelles plus importante en phase exponentielle de croissance (Tableau 2).

En phase exponentielle de croissance uniquement, les gènes *qseB* et *qseC*, codant des protéines du quorum sensing, et *recA*, codant la protéine RecA du système SOS, étaient sur-exprimés (Tableau 2). En phase stationnaire de croissance, des gènes impliqués dans le chimiotactisme (*che* et *tap*) étaient sur-exprimés par EDL933 (Tableau 2).

Enfin, des gènes codant des systèmes de captation du fer étaient sur-exprimés tout au long de l'incubation en contenus d'intestin grêle (Tableau 2).

I.3.1.3. Dans les contenus de rectum

Dans les contenus de rectum, la souche EHEC EDL933 a sur-exprimé des gènes impliqués dans la biogénèse de flagelles, dans le chimiotactisme et dans des systèmes d'acquisition du fer aux deux points d'incubation étudiés (Tableau 2). Les gènes sur-exprimés impliqués dans la formation de flagelles étaient plus nombreux en phase exponentielle de croissance et en comparaison avec l'intestin grêle. De plus, en phase exponentielle de croissance, l'expression de ces gènes était plus importante qu'en contenus d'intestin grêle (Tableau 2). En phase stationnaire de croissance uniquement, le gène *acfC*, le gène *ler*, codant le régulateur transcriptionnel du LEE et le gène *hlyA*, codant l'hémolysine A, étaient sur-exprimés par EDL933 en contenus de rectum (Tableau 2). L'expression du gène *acfC* était plus importante en contenus de rectum qu'en rumen (Tableau 1, Tableau 2).

**Tableau 2 : Gènes sur-exprimés par ED1933 en contenus d'intestin grêle et de rectum impliqués dans l'adhésion et la virulence en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log2FC > 2)**

Numéro	Gène	Produit du gène	Phase exponentielle			Phase stationnaire				
			Intestin grêle Log2FC	q-value	Rectum Log2FC	q-value	Intestin grêle Log2FC	q-value	Rectum Log2FC	q-value
<b>Système de captation du fer</b>										
Z0459	<i>ofuB</i>	Transport des ions Fe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	2,1	1,02E-02	2,1	1,16E-02	NDE	NDE	3,5	5,33E-06
NA	<i>fbpC</i>	Transport des ions Fe <sub>2</sub> <sup>+</sup>	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	2,9	1,08E-04
Z4763	<i>feoA</i>	Transport des ions Fe <sup>2+</sup> (protéine A)	NDE	NDE	NDE	3,1	1,35E-12	NDE	NDE	NDE
Z4764	<i>feoB</i>	Transport des ions Fe <sup>2+</sup> (protéine B)	NDE	NDE	NDE	2,3	3,98E-08	NDE	NDE	NDE
<b>Flagelle</b>										
Z1710	<i>flgA</i>	Protéine flagellaire du corps basal	NDE	NDE	3,0	7,71E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z1711	<i>flgB</i>	Protéine flagellaire du corps basal	4,2	2,71E-05	6,6	1,90E-11	NDE	NDE	3,3	9,80E-04
Z1712	<i>flgC</i>	Protéine flagellaire du corps basal	4,3	2,94E-05	6,5	7,00E-11	NDE	NDE	3,6	4,40E-04
Z1713	<i>flgD</i>	Protéine flagellaire du corps basal	4,1	1,04E-05	6,4	4,35E-12	NDE	NDE	3,8	6,26E-05
Z1714	<i>flgE</i>	Protéine flagellaire du crochet	3,7	3,38E-05	5,7	8,29E-11	NDE	NDE	3,2	5,38E-04
Z1715	<i>flgF</i>	Protéine flagellaire du corps basal	4,1	1,28E-05	5,9	1,96E-10	NDE	NDE	2,8	5,53E-03
Z1716	<i>flgG</i>	Protéine flagellaire du corps basal	3,6	8,52E-05	5,6	8,62E-10	NDE	NDE	2,6	7,14E-03
Z1717	<i>flgH</i>	Protéine précurseur de l'anneau	2,6	6,14E-03	4,8	8,78E-08	NDE	NDE	2,9	2,09E-03
Z1718	<i>flgI</i>	Protéine précurseur de l'anneau	2,3	1,74E-02	4,3	2,10E-06	NDE	NDE	2,1	2,83E-02
Z1719	<i>flgJ</i>	Protéine flagellaire	2,2	2,55E-02	4,3	2,67E-06	NDE	NDE	2,1	3,08E-02
Z1720	<i>flgK</i>	Protéine flagellaire du crochet	2,7	6,30E-03	5,2	2,54E-08	NDE	NDE	NDE	NDE
Z1721	<i>flgL</i>	Protéine flagellaire du crochet	NDE	NDE	3,5	4,45E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z1709	<i>flgM</i>	Protéine flagellaire du crochet	NDE	NDE	4,0	3,50E-06	NDE	NDE	NDE	NDE
Z1708	<i>flgN</i>	Régulateur négatif du flagelle	NDE	NDE	3,2	9,86E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z2932	<i>flhA</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	3,8	2,05E-06	NDE	NDE	NDE	NDE
Z2934	<i>flhB</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	3,9	3,68E-06	NDE	NDE	NDE	NDE
Z2945	<i>flhC</i>	Activateur transcriptionnel du flagelle	NDE	NDE	2,7	1,97E-06	2,8	5,37E-07	2,6	3,97E-06
Z2946	<i>flhD</i>	Activateur transcriptionnel du flagelle	2,1	6,26E-04	2,4	1,07E-04	2,8	5,11E-06	2,6	2,79E-05
Z3012	<i>fliA</i>	ARN polymérase	2,2	3,14E-02	5,4	2,36E-08	NDE	NDE	2,5	1,40E-02
Z3014	<i>fliD</i>	Protéine flagellaire du crochet	NDE	NDE	5,2	3,97E-08	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3027	<i>fliE</i>	Protéine flagellaire du corps basal	NDE	NDE	3,6	7,15E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3028	<i>fliF</i>	Protéine précurseur de l'anneau	NDE	NDE	4,6	6,12E-07	NDE	NDE	3,5	2,26E-04
Z3029	<i>fliG</i>	Protéine flagellaire du moteur	2,1	2,23E-02	4,3	1,06E-06	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3030	<i>fliH</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	3,9	2,81E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3031	<i>fliI</i>	ATP synthase du flagelle	NDE	NDE	4,0	2,07E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3033	<i>fliK</i>	Protéine flagellaire du crochet	NDE	NDE	4,0	2,35E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3034	<i>fliL</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	5,0	4,74E-07	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3035	<i>fliM</i>	Protéine flagellaire du moteur	2,2	2,59E-02	5,0	4,07E-08	NDE	NDE	2,6	7,79E-03
Z3036	<i>fliN</i>	Protéine flagellaire du moteur	2,7	8,69E-03	4,9	6,12E-07	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3037	<i>fliO</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	3,8	3,69E-05	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3038	<i>fliP</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	2,5	1,23E-02	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3039	<i>fliQ</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	2,0	3,50E-02	NDE	NDE	NDE	NDE
Z3015	<i>fliS</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	4,9	1,96E-07	2,2	3,84E-02	NDE	NDE
Z3016	<i>fliT</i>	Protéine flagellaire	NDE	NDE	3,7	1,21E-04	NDE	NDE	NDE	NDE

Z3011	<i>fljZ</i>	Régulateur	NDE	3,7	4,89E-05	NDE	NDE	2,69E-02
Z2944	<i>motA</i>	Protéine chimiotactique	2,4	2,46E-02	9,46E-07	2,9	6,52E-03	2,4
Z2943	<i>motB</i>	Protéine chimiotactique	NDE	5,0	3,95E-08	2,7	5,03E-03	2,2
<b>Chimiotactisme</b>								
Z2942	<i>cheA</i>	Kinase	NDE	4,8	6,81E-07	3,0	3,79E-03	2,5
Z2937	<i>cheB</i>	Méthyltransférase	NDE	4,8	3,04E-07	2,2	3,16E-02	NDE
Z2938	<i>cheR</i>	Protéine du chimiotactisme	NDE	4,3	3,60E-06	NDE	NDE	NDE
Z2936	<i>cheY</i>	Protéine du chimiotactisme	NDE	4,9	2,66E-07	2,2	3,63E-02	NDE
Z2935	<i>cheZ</i>	Protéine du chimiotactisme	NDE	4,9	1,50E-07	2,3	2,73E-02	NDE
Z2939	<i>Tap</i>	Récepteur peptidique	NDE	4,9	2,25E-07	2,3	2,56E-02	NDE
Z2940	<i>Tar</i>	Récepteur de l'aspartate	NDE	4,7	8,42E-07	NDE	NDE	NDE
<b>Quorum sensing</b>								
Z4377	<i>qseB</i>	Régulateur du quorum sensing	2,5	2,53E-08	NDE	NDE	NDE	NDE
Z4378	<i>qseC</i>	Régulateur du quorum sensing	2,4	1,59E-11	NDE	NDE	NDE	NDE
<b>Système SOS</b>								
Z4002	<i>recA</i>	Protéine recombinante	2,2	1,83E-08	NDE	NDE	NDE	NDE
<b>Facteur de virulence</b>								
Z2053	<i>acfC</i>	Facteur de colonisation accessoire	NDE	NDE	NDE	NDE	3,2	1,83E-03
Z_L7048	<i>hlyA</i>	Hémolysine A	NDE	NDE	NDE	NDE	3,4	1,39E-42
Z5140	<i>ler</i>	Régulateur transcriptionnel du LEE	NDE	NDE	NDE	NDE	2,9	3,06E-04

NA : non assigné

NDE : non différenciellement exprimé

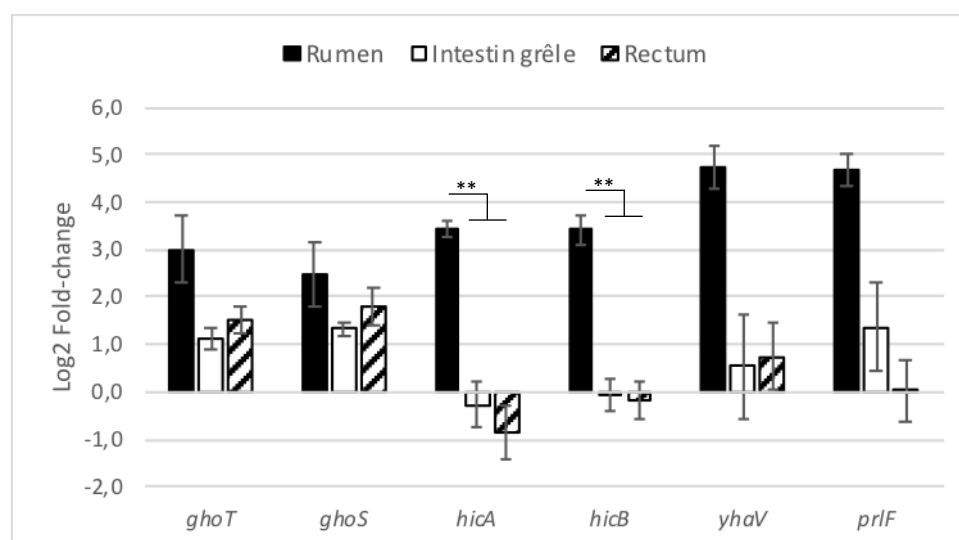
## I.3.2. Expression de gènes impliqués dans la résistance au stress

En contenus ruminiaux, EDL933 a activé la transcription de gènes codant des systèmes de résistance à la carence nutritionnelle en carbone et en phosphate, aux stress acide, osmotique et oxydatif ainsi que des systèmes toxine/anti-toxine (TA) (Tableau 3). Les gènes *ghoT/ghoS* et *hicA/hicB*, codent les deux composantes des systèmes TA, et le gène *yhaV*, code la toxine du système TA YhaV/PrIF.

Aux deux stades de croissance en contenus d'intestin grêle, des gènes codant des systèmes de résistance à la carence en carbone et aux stress oxydatif et acide étaient sur-exprimés par EDL933 (Tableau 3). Les gènes *ghoT/ghoS* du système TA étaient également sur-exprimés par EDL933 au cours des deux phases de croissance mais leurs niveaux d'expression étaient inférieurs à ceux observés dans le rumen après 6 heures de culture (Tableau 3).

Enfin, la transcription de gènes codant des systèmes de résistance à la carence en carbone et au stress oxydatif était également altérée par EDL933 incubée en contenus de rectum tout au long de sa croissance (Tableau 3). Des systèmes de résistance au stress acide étaient sur-exprimés au cours de la phase exponentielle de croissance (Tableau 3). La transcription de gènes codant des systèmes TA n'était pas altérée au cours de l'incubation en contenus de rectum.

Les profils d'expression relative des systèmes TA obtenus par RNA-Seq en début de phase stationnaire de croissance ont été vérifiés par RT-qPCR à l'aide des couples d'amorces décrits en Annexe 1. Comme attendu, les gènes *ghoT* et *ghoS* étaient significativement sur-exprimés au cours de l'incubation en contenus de rumen et d'intestin grêle, mais également en contenus de rectum en comparaison avec le milieu M9-Glc. Les gènes *hicA*, *hicB*, *yhaV* et *prIF* étaient significativement sur-exprimés par la souche EDL933 incubée uniquement en contenus de rumen en comparaison avec le milieu M9-Glc (Figure 5). Le gène *prIF* n'était cependant pas sur-exprimé d'après les résultats du RNA-Seq.



**Figure 5 : Niveaux d'expression relative par RT-qPCR des gènes codant les systèmes toxine/anti-toxine.** Les profils d'expression ont été obtenus en conditions « contenus digestifs » versus « milieu minimum M9-Glc » en début de phase stationnaire de croissance. Les différences d'expression obtenues entre les contenus digestifs étaient significatives quand  $p < 0,05$  (One-way ANOVA avec le test de Tukey ; \*\*  $p < 0,01$ ).

**Tableau 3 : Gènes sur-exprimés par EDL933 en contenus de rumen, d'intestin grêle et de rectum impliqués dans la résistance aux stress en comparaison avec le milieu M9-Glc (Log2FC > 2)**

Numéro	Gène	Produit du gène	Phase exponentielle			Phase stationnaire							
			Intestin grêle	Rectum	Intestin grêle	Rumen	Rectum						
			Log2FC	q-value	Log2FC	q-value	Log2FC	q-value					
<b>Carence en carbone</b>													
Z1389	<i>hyaA</i>	Hydrogénase (petite sous-unité)	2,6	3,08E-03	2,5	6,62E-03	5,7	9,23E-12	6,2	3,71E-14	2,4	8,91E-03	
Z5953	<i>yjiY</i>	Protéine putative	4,2	1,80E-06	3,4	2,29E-04	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
<b>Carence en phosphate</b>													
Z0497	<i>phoB</i>	Système à deux composants	NDE	NDE	NDE	2,14	1,07E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z0498	<i>phoR</i>	Système à deux composants	NDE	NDE	NDE	2,11	1,23E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
<b>Stress acide</b>													
Z5719	<i>adiA</i>	Arginine décarboxylase	NDE	NDE	2,0	4,08E-03	3,12	1,99E-06	3,7	3,22E-10	NDE	NDE	
Z5718	<i>adiY</i>	Activateur transcriptionnel	2,6	4,56E-04	NDE	2,30	1,60E-03	2,7	NDE	1,60E-05	NDE	NDE	
Z4922	<i>hdeA</i>	Protéine chaperonne	2,2	2,53E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z4921	<i>hdeB</i>	Protéine chaperonne	NDE	NDE	2,0	3,29E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z4376	<i>ygiW</i>	Protéine hypothétique	2,8	1,38E-10	2,1	1,17E-05	3,0	2,87E-12	3,2	3,71E-14	NDE	NDE	
Z4926	<i>yhiU</i>	Protéine membranaire	NDE	NDE	NDE	2,0	1,32E-05	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
<b>Stress osmotique</b>													
Z2523	<i>osmB</i>	Lipoprotéine	NDE	NDE	NDE	2,9	2,95E-05	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
<b>Stress oxydatif</b>													
Z0749	<i>ahpC</i>	Péroxirédoxine	3,4	9,41E-07	4,0	1,14E-08	NDE	2,5	5,06E-04	3,2	4,49E-06	4,1	4,11E-07
Z0750	<i>ahpF</i>	Réductase hyperoxyde alkyl	4,0	4,94E-07	4,8	1,90E-09	NDE	3,1	1,54E-04	4,1	1,15E-05	3,2	1,15E-05
Z1034	<i>dps</i>	Protéine de fixation à l'ADN	5,3	7,92E-15	5,9	8,14E-18	2,7	2,48E-04	NDE	3,91E-05	4,8	7,21E-11	
Z0173	<i>htrA</i>	Sérine protéase	2,3	2,92E-03	3,5	5,58E-06	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z5661	<i>soxS</i>	Activateur transcriptionnel	NDE	NDE	2,5	2,07E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z1611	<i>terA</i>	Protéine de résistance au tellurite	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	2,1	4,67E-08	
Z1610	<i>terZ</i>	Protéine de résistance au tellurite	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	2,2	5,86E-07	
Z0006	<i>yaaA</i>	Protéine hypothétique	2,8	4,07E-05	3,6	6,36E-08	NDE	NDE	NDE	2,9	1,65E-05	NDE	
Z4259	<i>yggE</i>	Protéine putative	NDE	NDE	NDE	2,7	1,06E-06	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
<b>Système toxine/anti-toxine</b>													
Z5730	<i>ghoS</i>	Anti-toxine	2,2	7,07E-04	NDE	2,6	9,55E-08	2,3	4,82E-06	NDE	NDE	NDE	
Z5731	<i>ghoT</i>	Toxine	3,2	4,27E-09	NDE	3,0	4,19E-07	2,2	6,19E-04	NDE	NDE	NDE	
NA	<i>hica</i>	Toxine	NDE	NDE	NDE	2,0	8,90E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z2281	<i>hicB</i>	Anti-toxine	NDE	NDE	NDE	2,2	2,77E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	
Z4482	<i>yhaV</i>	Toxine	NDE	NDE	NDE	2,4	2,10E-03	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	

NA : non assigné

NDE : non différentiellement exprimé



## I.4. Conclusion

Le rumen, l'intestin grêle et le rectum représentent trois compartiments digestifs aux propriétés physico-chimiques différentes (pH, composition en AGV, diversité du microbiote endogène) impactant la croissance et la survie de la souche EHEC EDL933. La persistance des EHEC dans le tube digestif bovin est due à sa capacité à utiliser les sources de nutriments disponibles, à coloniser l'intestin et à résister à différents stress rencontrés dans le tube digestif de l'animal. L'analyse transcriptomique a montré que la souche EHEC EDL933 induisait de nombreux gènes du métabolisme lui permettant de disposer d'une grande variété de sources de nutriments présentes dans les contenus de rumen, d'intestin grêle et de rectum et potentiellement nécessaires à sa survie et sa multiplication (voir I.2. Publication). Un grand nombre de ces nutriments est issu de la dégradation de substrats endogènes, tels que le mucus ou le glycocalix sécrétés par les cellules épithéliales. La souche EHEC EDL933 incubée dans les contenus des trois compartiments a également activé des gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion et la colonisation mais aussi des systèmes de résistance à différents stress rencontrés dans le tube digestif bovin.

De nombreux facteurs des EHEC sont connus pour leur rôle dans l'adhésion à l'épithélium intestinal du tube digestif du bovin tels que les flagelles, les curli, les pili ECP et HCP, et les fimbriae F9 et ELF. Le nombre de gènes impliqués dans la formation du flagelle est élevé dans les deux compartiments digestifs postérieurs, l'intestin grêle et le rectum, en comparaison avec le rumen, suggérant une synthèse de flagelles importante. Le flagelle est considéré comme un facteur d'adhésion à distance permettant aux EHEC de se rapprocher de l'épithélium intestinal et la présence de FlhC est connue pour permettre une meilleure survie des EHEC O157 dans les contenus de rumen et de duodénum de bovin (Dobbin *et al.*, 2006). Ainsi, les bactéries seraient mieux préparées à coloniser et à persister dans les compartiments digestifs postérieurs que dans le rumen qui n'est pas considéré comme un site de colonisation des EHEC. Une fois en contact avec l'épithélium, l'expression du flagelle est réduite (Mahajan *et al.*, 2009), favorisant la colonisation de l'intestin des mammifères (Dobbin *et al.*, 2006; Leatham *et al.*, 2005). La souche EHEC EDL933 semble également mettre en place un mécanisme de chimiotactisme dans les contenus digestifs postérieurs. Le chimiotactisme permet aux bactéries de contrôler la direction du flagelle en réponse à différents substrats attractants (sérine et aspartate) ou répulsifs (indole) (Fukuoka *et al.*, 2012). Ainsi, le flagelle contribuerait à la survie des EHEC en leur permettant d'utiliser plus efficacement des substrats tels que les acides aminés ou les sucres qui représentent des sources de carbone et d'azote importantes pour les EHEC dans les contenus digestifs bovins (voir I.2. Publication).

Dans les contenus d'intestin grêle et de rectum, la souche EHEC EDL933 semble utiliser au moins trois systèmes de captation du fer qui est essentiel à la survie des bactéries au sein d'un hôte. Les ions  $Fe_2^+$  représentent une source de fer essentielle à la colonisation de l'intestin murin par les *E. coli* grâce au sidérophore Feo, exprimé en conditions anaérobies (Stojiljkovic *et al.*, 1993). Le transport des ions  $Fe_3^+$  via les sidérophores Afu et FbpC semble également essentiel puisque AfuB représente un système d'acquisition du fer qui peut jouer un rôle important dans la virulence des bactéries pathogènes (Adhikari *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1996). Ainsi, la disponibilité en sources de fer dans les contenus digestifs postérieurs favoriserait la survie de la souche EHEC EDL933.

La souche EDL933 a également activé des gènes codant des protéines impliquées dans le quorum sensing dans les contenus d'intestin grêle. Le quorum sensing est un système de communication bactérienne bien connu chez les *E. coli* (Sperandio, 2010). Le récepteur QseC est capable d'induire,

via RecA, la production des Shiga-toxines Stx1 et Stx2, en réponse aux molécules adrénérgiques de l'hôte et aux molécules sécrétées par le microbiote intestinal (Moreira & Sperandio, 2016; Reading *et al.*, 2009). En réponse à ces différentes molécules, les protéines QseC et QseB vont également activer l'expression de gènes codant des facteurs impliqués dans l'adhésion, tels que le flagelle et le LEE (Mellies & Lorenzen, 2014; Pifer & Sperandio, 2014). De plus, nous avons observé que, dans les contenus de rectum, le régulateur Ler, l'hémolysine A et une adhésine AcfC (Paa) étaient sur-exprimés par EDL933. Le rôle de l'adhésine AcfC dans la colonisation du rectum bovin par les EHEC O157:H7 ainsi que son expression et son rôle au cours de l'infection chez l'Homme restent à déterminer. Il a toutefois été montré que le facteur AcfC, souvent présent chez les souches AEEC et EHEC O157:H7, est absent chez les *E. coli* non pathogènes et est requis pour le développement des lésions A/E par les EPEC atypiques (Batisson *et al.*, 2003). Cependant, son expression en contenus de rumen est inattendue et suggère que le rôle de ce facteur ne se limiterait pas à l'adhésion.

Pour persister, les EHEC doivent également résister aux stress rencontrés dans le tube digestif animal. Dans les contenus intestinaux, la souche EHEC EDL933 semble mettre en place de multiples systèmes de résistance au stress, notamment les stress acide et oxydatif mais aussi des systèmes de lutte contre la carence nutritionnelle. La régulation de ces systèmes est extrêmement complexe et des analyses complémentaires de la réponse transcriptomique sont nécessaires afin d'étudier de manière plus précise les systèmes de résistance aux stress et leurs régulateurs. Dans le rumen principalement, plusieurs systèmes toxine/anti-toxine (TA) étaient activés. De manière générale, les systèmes TA, classés en six catégories, favorisent l'état de dormance en cas de stress et ainsi la persistance cellulaire (Page & Peti, 2016). GhoT (toxine)/GhoS (anti-toxine) est l'unique système TA connu du groupe V qui engendre une réduction du métabolisme bactérien et provoque un état de dormance (cellules fantômes) des *E. coli* suite à un stress chimique (Page & Peti, 2016; Wang *et al.*, 2013). Dans les contenus digestifs, les gènes *ghoT* et *ghoS* étaient transcrits à des niveaux équivalents, suggérant que la toxine n'était pas induite puisqu'en condition de stress, l'ARNm de GhoS est dégradé par une RNase (Page & Peti, 2016). Les systèmes TA de type II, HicA/HicB et YhaV/PrIF, ciblent les ribosomes, inhibent la synthèse protéique et par conséquent la croissance cellulaire en réponse à une carence nutritionnelle (Choi *et al.*, 2017; Turnbull *et al.*, 2017). Dans le rumen uniquement, les gènes *hicA*, *hicB*, *yhaV* et *prIF* étaient également transcrits à des niveaux équivalents (RT-qPCR). Dans des conditions favorables, l'anti-toxine (HicB ; PrIF) inhibe la transcription des gènes codant la toxine et l'anti-toxine (*hicA* et *hicB* ; *yhaV* et *prIF*) et dans des conditions de stress, des protéases cellulaires dégradent l'anti-toxine (HicB ; PrIF). Ceci suggère que, dans le contenu de rumen, les toxines HicA et YhaV sont actives. Ainsi, les toxines HicA et YhaV pourraient favoriser la persistance de la souche EDL933 dans les contenus de rumen. Il est également possible d'envisager que ces systèmes TA pourraient contribuer à l'inhibition de la croissance des souches *E. coli* observée dans le rumen.

Pour conclure, le RNA-Seq nous a permis de montrer que la souche EHEC O157:H7 EDL933 activait un grand nombre de gènes lui permettant de survivre et de persister dans le tube digestif du bovin. Bien que leur connaissance nous permette à ce jour de mieux comprendre la physiologie des EHEC dans le tube digestif de l'animal, il est important de rappeler que le RNA-Seq a permis une quantification de l'expression relative des gènes entre des conditions d'intérêt (ici, les contenus digestifs filtrés) et une condition de référence (le milieu minimum M9-Glc). Ainsi, ces conditions ne reflètent pas totalement les conditions physiologiques rencontrées dans le tube digestif de l'animal (présence de l'épithélium et du microbiote commensal). Les résultats obtenus nous ouvrent cependant plusieurs pistes de





Chapitre II Caractérisation génomique et phénotypique  
de la souche *E. coli* O157:H7 MC2 persistante dans un  
élevage bovin en France



## II.1. Introduction

La souche *E. coli* O157:H7 MC2 a été isolée par l'ENVT de fèces de bovins à l'abattoir, par deux fois au cours de différentes campagnes de prélèvements, réalisées sur une période d'un an, dans des élevages bovins français porteurs de souches STEC O157:H7. Cette souche a donc persisté dans l'environnement d'un même élevage pendant une longue période. Les objectifs de la seconde partie de la thèse étaient (i) de rechercher les facteurs d'adhésion, de colonisation et de virulence de la souche *E. coli* O157:H7 MC2 par une approche génomique, (ii) de caractériser *in vitro* le potentiel de virulence de la souche MC2 et (iii) de caractériser sa persistance dans le tube digestif du bovin et dans l'environnement de la ferme. En parallèle, la caractérisation génomique d'une souche *E. coli* commensale BG1 isolée de l'intestin grêle du bovin a été réalisée.

Le génome de la souche MC2 a été séquencé à la plateforme GeT-PlaGe de Genotoul de l'INRA d'Auzeville (Castanet-Tolosan, France) en utilisant comme référence le génome et le plasmide pO157 de la souche EHEC O157:H7 Sakai, responsable en 1996 d'une épidémie au Japon. La similarité de son génome et de son plasmide avec ceux de la souche Sakai a suggéré que la souche MC2 possédait des caractéristiques similaires aux souches cliniques. Ainsi, nous avons réalisé une analyse détaillée du génome de la souche MC2 et l'avons comparé à d'autres souches *E. coli* O157:H7 afin de déterminer sa position phylogénétique. De plus, les facteurs de virulence et d'adhésion ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilms ont été recherchés.

Le potentiel de virulence de la souche MC2 a été étudié en testant la production et l'activité cytotoxique des toxines Stx sur les cellules Vero et sa capacité à former des lésions A/E sur cellules HeLa par le test FAS (« Fluorescent-Actin Staining test »). L'adaptation de la souche au tube gastro-intestinal du bovin a été étudiée en suivant la croissance de MC2 dans le contenu de différents compartiments digestifs bovins en présence du microbiote endogène. Les contenus digestifs ont été obtenus lors de l'abattage de trois bovins adultes à l'abattoir expérimental de l'INRA. La souche MC2 résistante à la rifampicine (Rif<sup>R</sup>) a été inoculée aux contenus digestifs dans des conditions mimant au mieux les conditions physiologiques du tube digestif du bovin. Sa croissance a été comparée à celle de la souche EHEC de référence EDL933.

La persistance dans l'environnement, observée pour la souche MC2 en élevage, a été d'abord caractérisée en suivant la survie de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans des contenus de rectum en présence du microbiote endogène et incubées à 15°C en aérobiose afin de mimer une persistance dans les fèces bovines dans l'environnement. Puisque la formation de biofilms par les bactéries consiste en une forme de résistance, nous avons testé la capacité de la souche MC2 à former des biofilms, par la méthode au cristal violet, dans les fèces et dans un milieu minimum (M9-Glc). Le microbiote endogène a été éliminé par des étapes de centrifugation et de filtration afin de déterminer spécifiquement la capacité de formation de biofilm par la souche MC2 et de la comparer à celle des souches EDL933 et BG1. La formation de biofilm des souches a été suivie à 15°C (température mimant l'environnement) et à 39°C (température interne du bovin) dans les fèces filtrées et le milieu M9-Glc pendant plusieurs jours.

Enfin, l'étude transcriptomique, réalisée précédemment sur la souche EDL933 et détaillée dans le chapitre I, nous a également permis de cibler des gènes codant des systèmes de résistance au stress et d'approfondir cette étude par RT-qPCR chez la souche MC2 incubée dans des conditions mimant des fèces excrétées dans l'environnement *versus* un milieu minimum M9-Glc. Pour cela, les fèces

prélevées au niveau de rectum du bovin ont été filtrées afin de s'affranchir de la présence du microbiote endogène et d'étudier spécifiquement la réponse transcriptomique de la souche MC2 aux stress rencontrés dans l'environnement. La souche MC2 a été cultivée en fèces filtrées à 15°C pendant plusieurs jours en aérobiose et les ARN ont été récupérés lorsque la souche atteignait la phase stationnaire de croissance (7 jours d'incubation), phase pour laquelle nous avons supposé que les bactéries mettaient en place un grand nombre de systèmes de résistance aux stress. Les ARN ont été extraits par une méthode d'extraction au phénol/chloroforme et leur qualité a été vérifiée au Bioanalyser 2100 (Agilent). Au total, l'expression relative de 49 gènes représentatifs des différents systèmes de résistance aux stress a été déterminée par RT-qPCR. Parmi les 49 gènes testés chez MC2, certains ont montré une sur-expression qui a été ensuite comparée avec celle des souches EDL933 et BG1.

Le génome de la souche *E. coli* commensale bovine BG1 a également été séquencé à la plateforme GeT-PlaGe de Genotoul de l'INRA d'Auzeville (Castanet-Tolosan, France) et a été annoté et caractérisé. Il nous semblait en effet important de disposer d'informations génomiques sur cette souche intestinale bovine que nous utilisons comme référence de souche commensale. De plus, peu de séquences génomiques de souches commensales d'origine bovine sont actuellement disponibles dans les bases de données. Le génome de BG1 a été comparé à celui de souches *E. coli* commensales d'origine bovine et humaine et pathogènes chez le bovin et chez l'Homme. Les facteurs de virulence tels que les systèmes de captation du fer, les systèmes d'adhésion et les flagelles ont été recherchés et l'absence des facteurs de virulence des EHEC, tels que les toxines Stx, a été vérifiée. Au laboratoire, il a précédemment été montré que la souche BG1 n'était pas capable d'utiliser l'éthanolamine comme source de nutriment dans l'intestin du bovin contrairement aux souches EHEC EDL933 et Sakai (Bertin *et al.*, 2011). Ainsi, les gènes *eut* présents sur le génome de BG1 ont été comparés à ceux portés sur le génome de EDL933 afin de mettre en évidence des différences qui pourraient expliquer les inégalités d'utilisation de l'éthanolamine par les deux souches.

La partie des résultats concernant le séquençage du génome de la souche MC2 ainsi que sa caractérisation génomique et phénotypique a été présentée dans les publications suivantes : « Draft genome sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France », publiée dans « Genome Announcement » et « Factors involved in the persistence of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content », publiée dans « Frontiers in Microbiology ».

La deuxième partie des résultats concernant la caractérisation du génome de la souche *E. coli* commensale d'origine bovine a été développée dans la publication suivante : « Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract », publiée dans « Standards in Genomic Sciences ».

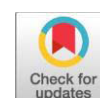


## II.2. Draft genome sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France



genomeA announcements™

### PROKARYOTES



# Draft Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strain MC2 Isolated from Cattle in France

Pauline Auffret,<sup>a\*</sup> Audrey Segura,<sup>a</sup> Yolande Bertin, Christophe Klopp,<sup>b</sup> Olivier Bouchez,<sup>c</sup> Monique Kérourédan,<sup>d</sup> Delphine Bibbal,<sup>d</sup> Hubert Brugère,<sup>d</sup> Evelyne Forano<sup>a</sup>

Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, Clermont-Ferrand, France<sup>a</sup>; Plateforme Bioinformatique Toulouse, Midi-Pyrénées UBIA, INRA, Auzeville Castanet-Tolosan, France<sup>b</sup>; GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville, Castanet-Tolosan, France<sup>c</sup>; IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France<sup>d</sup>

**ABSTRACT** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) with serotype O157:H7 is a major foodborne pathogen. Here, we report the draft genome sequence of EHEC O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France. The assembly contains 5,400,376 bp that encoded 5,914 predicted genes (5,805 protein-encoding genes and 109 RNA genes).

**E**nterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) with serotype O157:H7 is a major foodborne pathogen responsible for serious human diseases, such as hemolytic-uremic syndrome (HUS) (1). The gastrointestinal tract of cattle is the primary reservoir of EHEC O157:H7, which can be transmitted from cattle to humans by means of contaminated meat or unpasteurized milk (1). In this report, we present the draft genome sequence of EHEC O157:H7 strain MC2 isolated in France from cattle on a farm in which persistent shedding has been observed (2). Using real-time PCR (3, 4), MC2 was confirmed to belong to serotype O157:H7 and to carry key virulence genes of EHEC O157:H7: *eae-1* encoding intimin (bacterial attachment to human epithelial cells) and *stx1* and *stx2* encoding Shiga toxins (responsible for HUS).

We sequenced *E. coli* MC2 because a better understanding of the nature of *E. coli* O157:H7 colonization of cattle is required to develop more effective preharvest food safety practices and to reduce the contamination of food of bovine origin.

*E. coli* MC2 was cultured on Luria-Bertani medium, and the genomic DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Whole-genome sequencing was performed at the GeT-PlaGe core facility (INRA Toulouse, France [<http://get.genotoul.fr/>]). DNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols (Illumina TruSeq Nano DNA LT library prep kit). DNA-seq experiments were performed on an Illumina MiSeq instrument using a paired-end read length of 2X 250 bp with the Illumina MiSeq reagent kit v2. The raw reads were stored in NG6 (5) and quality checked using FastQC (6). They were assembled with

Received 4 September 2017 Accepted 6 September 2017 Published 5 October 2017

**Citation** Auffret P, Segura A, Bertin Y, Klopp C, Bouchez O, Kérourédan M, Bibbal D, Brugère H, Forano E. 2017. Draft genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France. Genome Announc 5:e01097-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01097-17>.

**Copyright** © 2017 Auffret *et al.* This is an openaccess article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Yolande Bertin, [yolande.bertin@inra.fr](mailto:yolande.bertin@inra.fr).

\* Present address: Pauline Auffret, Centre Ifremer du Pacifique, Département Ressources Biologiques et Environnement, Unité Ressources Marines en Polynésie Française (RMPF), Taravao, Tahiti, French Polynesia.

P.A. and A.S. contributed equally to this work.

SPAdes v3.1.1 (7) using standard parameters and annotated with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (8).

The resulting assembly consisted of 265 contigs. The MC2 genome comprised 5,400,376 bp with a GC content of 50.34% and contained 5,805 protein-encoding genes (4,560 proteins with predicted functions and 4,144 assigned to cluster of orthologous groups (COG) of proteins using BLASTp) and 109 RNA genes. The contigs were aligned to the *E. coli* Sakai genome (NCBI Reference Sequence NC\_002695) and pO157 plasmid (NC\_002128) using Mauve (v2.3.1). The EHEC strain Sakai, isolated from a large-scale outbreak in Japan, is a standard reference for comparative genomic studies of O157:H7 *E. coli* (9). This analysis revealed that 94.19% of pO157 was covered by MC2 contigs (99.93% of homology). A total of 71 out of the 85 genes carried by plasmid pO157 were present in the MC2 assembly (average homology, 99.74%), suggesting that MC2 carries at least one major plasmid homolog to pO157. Comparison of MC2 and Sakai genes using BLASTn (70% coverage and identity cutoff) demonstrated that 4,608 of the MC2 functional genes were present in *E. coli* O157:H7 Sakai, showing an average homology of 99.91%. Only 803 genes were unique to MC2. The high homology between the two genomes suggests that the bovine *E. coli* strain MC2 possesses the characteristic of an EHEC strain potentially responsible for clinical cases.

**Accession number(s).** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number [NJDB00000000](https://ncbi.nlm.nih.gov/nucl/NJDB00000000). The version described in this paper is version NJDB01000000.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed in collaboration with the GeT core facility, Toulouse, France, and was supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of the “Investissement d’avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09) (the funders had no role in study design, data collection or interpretation or in submission of the work for publication). P.A. was supported by CASDAR (Compte d’Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural; FranceAgrimer EDP 0914000451) and Interbev (Interprofession bétail et viande).

We are grateful to the Genotoul Bioinformatics Platform Toulouse Midi-Pyrénées (Genotoul Bioinfo) for providing computing and storage resources.

## REFERENCES

1. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140:360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>.
2. Bibbal D, Loukiadis E, Kérourédan M, Ferré F, Dilasser F, Peytavin de Garam C, Cartier P, Oswald E, Gay E, Auvray F, Brugère H. 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol* 81:1397–1405. <https://doi.org/10.1128/AEM.03315-14>.
3. Auvray F, Lecureuil C, Dilasser F, Taché J, Derzelle S. 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett Appl Microbiol* 48:554–559. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02561.x>.
4. Madic J, Peytavin de Garam C, Vingadassalon N, Oswald E, Fach P, Jamet E, Auvray F. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J Appl Microbiol* 109:1696–1705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04798.x>.
5. Mariette J, Escudé F, Allias N, Salin G, Noirot C, Thomas S, Klopp C. 2012. NG6: integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics* 13:462. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-462>.
6. Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
8. Angiuoli SV, Gussman A, Klimke W, Cochrane G, Field D, Garrity G, Kodira CD, Kyripides N, Madupu R, Markowitz V, Tatusova T, Thomson N, White O. 2008. Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *Omics* 12:137–141. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0017>.
9. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, 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, Shinagawa H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8:11–22. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.1.11>.

### II.3. Factors involved in the persistence of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content



Audrey Segura, Pauline Auffret, Delphine Bibbal, Marine Bertoni, Alexandra Durand, Grégory Jubelin, Monique Kérourédan, Hubert Brugère, Yolande Bertin and Evelyne Forano

#### Abstract

Healthy cattle are the primary reservoir for O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* responsible for human food-borne infections. Because farm environment acts as a source of cattle contamination, it is important to better understand the factors controlling the persistence of *E. coli* O157:H7 outside the bovine gut. The *E. coli* O157:H7 strain MC2, identified as a persistent strain in French farms, possessed the characteristics required to cause human infections and genetic markers associated with clinical O157:H7 isolates. Therefore, the capacity of *E. coli* MC2 to survive during its transit through the bovine gastro-intestinal tract (GIT) and to respond to stresses potentially encountered in extra-intestinal environments was analyzed. *E. coli* MC2 survived in rumen fluids, grew in the content of posterior digestive compartments and survived in bovine feces at 15°C predicting a successful transit of the bacteria along the bovine GIT and its persistence outside the bovine intestine. *E. coli* MC2 possessed the genetic information encoding 14 adherence systems including adhesins with properties related to colonization of the bovine intestine (F9 fimbriae, EhaA and EspP autotransporters, HCP pilus, FdeC adhesin) reflecting the capacity of the bacteria to colonize different segments of the bovine GIT. *E. coli* MC2 was also a strong biofilm producer when incubated in fecal samples at low temperature and had a greater ability to form biofilms than the bovine commensal *E. coli* strain BG1. Furthermore, in contrast to BG1, *E. coli* MC2 responded to temperature stresses by inducing the genes *cspA* and *htrA* during its survival in bovine feces at 15°C. *E. coli* MC2 also activated genes that are part of the GhoT/GhoS, HicA/HicB and EcnB/EcnA toxin/antitoxin systems involved in the response of *E. coli* to nutrient starvation and chemical stresses. In summary, the large number of colonization factors known to bind to intestinal epithelium and to biotic or abiotic surfaces, the capacity to produce biofilms and to activate stress fitness genes in bovine feces could explain the persistence of *E. coli* MC2 in the farm environment.

**Keywords:** *Escherichia coli*, STEC, EHEC, O157:H7, biofilms, stress response, persistence





OPEN ACCESS

**Edited by:**

Satoshi Tsuneda,  
Waseda University, Japan

**Reviewed by:**

Eelco Franz,  
Centre for Infectious Disease Control  
(RIVM), Netherlands  
Adriana Bentancor,  
Universidad de Buenos Aires,  
Argentina

Joseph M. Bosilevac,  
USDA-Agricultural Research Service  
(ARS) U.S. Meat Animal Research  
Center, United States

**\*Correspondence:**

Evelyne Forano  
evelyne.forano@inra.fr

**† Present Address:**

Pauline Auffret,  
Unité Ressources Marines en  
Polynésie Française (RMPPF),  
Département Ressources Biologiques  
et Environnement, Centre Ifremer du  
Pacifique, Tahiti, French Polynesia  
Marine Bertoni,  
Laboratoire de Police Scientifique de  
Marseille, Section Biologie, Institut  
National de Police Scientifique,  
Marseille, France

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Microbial Physiology and Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 18 December 2017

**Accepted:** 19 February 2018

**Published:** 09 March 2018

**Citation:**

Segura A, Auffret P, Bibbal D,  
Bertoni M, Durand A, Jubelin G,  
Kérourédan M, Brugère H, Bertin Y  
and Forano E (2018) Factors Involved  
in the Persistence of a Shiga  
Toxin-Producing *Escherichia coli*  
O157:H7 Strain in Bovine Feces and  
Gastro-Intestinal Content.  
*Front. Microbiol.* 9:375.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.00375

# Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content

Audrey Segura<sup>1</sup>, Pauline Auffret<sup>1†</sup>, Delphine Bibbal<sup>2</sup>, Marine Bertoni<sup>1†</sup>,  
Alexandra Durand<sup>1</sup>, Grégory Jubelin<sup>1</sup>, Monique Kérourédan<sup>2</sup>, Hubert Brugère<sup>2</sup>,  
Yolande Bertin<sup>1</sup> and Evelyne Forano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR-MEDIS, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France,

<sup>2</sup> IRSD, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Institut National de la Recherche Agronomique, ENVT, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France

Healthy cattle are the primary reservoir for O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* responsible for human food-borne infections. Because farm environment acts as a source of cattle contamination, it is important to better understand the factors controlling the persistence of *E. coli* O157:H7 outside the bovine gut. The *E. coli* O157:H7 strain MC2, identified as a persistent strain in French farms, possessed the characteristics required to cause human infections and genetic markers associated with clinical O157:H7 isolates. Therefore, the capacity of *E. coli* MC2 to survive during its transit through the bovine gastro-intestinal tract (GIT) and to respond to stresses potentially encountered in extra-intestinal environments was analyzed. *E. coli* MC2 survived in rumen fluids, grew in the content of posterior digestive compartments and survived in bovine feces at 15°C predicting a successful transit of the bacteria along the bovine GIT and its persistence outside the bovine intestine. *E. coli* MC2 possessed the genetic information encoding 14 adherence systems including adhesins with properties related to colonization of the bovine intestine (F9 fimbriae, EhaA and EspP autotransporters, HCP pilus, FdeC adhesin) reflecting the capacity of the bacteria to colonize different segments of the bovine GIT. *E. coli* MC2 was also a strong biofilm producer when incubated in fecal samples at low temperature and had a greater ability to form biofilms than the bovine commensal *E. coli* strain BG1. Furthermore, in contrast to BG1, *E. coli* MC2 responded to temperature stresses by inducing the genes *cspA* and *htrA* during its survival in bovine feces at 15°C. *E. coli* MC2 also activated genes that are part of the GhoT/GhoS, HicA/HicB and EcnB/EcnA toxin/antitoxin systems involved in the response of *E. coli* to nutrient starvation and chemical stresses. In summary, the large number of colonization factors known to bind to intestinal epithelium and to biotic or abiotic surfaces, the capacity to produce biofilms and to activate stress fitness genes in bovine feces could explain the persistence of *E. coli* MC2 in the farm environment.

**Keywords:** *Escherichia coli*, STEC, EHEC, O157:H7, biofilms, stress response, persistence

## INTRODUCTION

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) of serotype O157:H7 is a highly pathogenic subgroup of Stx-producing *E. coli* (STEC) with food-borne etiology responsible for severe clinical symptoms such as hemorrhagic colitis or hemolytic uremic syndrome (HUS) (Nataro and Kaper, 1998). The production of Shiga toxin (Stx) and intestinal attaching and effacing (A/E) lesions are the most important virulence attributes of these pathogens (Karmali, 1989; Nataro and Kaper, 1998). Ruminants are the principal reservoir of *E. coli* O157:H7 and fecal shedding is the main source of contamination of food and farm environments (Nataro and Kaper, 1998). Consequently, cattle play a significant role in the epidemics of human O157:H7 infections since outbreaks are mainly associated with the consumption of contaminated bovine food products (meat, raw milk, dairy products) as well as fruits or vegetables contaminated via irrigation water or ruminant manure (Karmali, 1989; Nataro and Kaper, 1998; Persad and LeJeune, 2014).

Farm environment acts as a source of cattle contamination. Colonization of cattle with *E. coli* O157:H7 is typically transient and the concentration and frequency of *E. coli* O157:H7 shedding vary among individual hosts. For example, cattle “super-shedder” (>more than 10<sup>4</sup> CFU *E. coli*/g of feces) is responsible for the presence of the majority of *E. coli* O157:H7 in the farm environment (Munns et al., 2016). Consequently, a decrease in *E. coli* O157:H7 shedding at the farm level is likely one of the most cost-effective and safe intervention strategies to prevent further food chain contamination (Soon et al., 2011). Several host and farm practices have been associated with the increase in *E. coli* O157:H7 prevalence including animal age, season or herd type (Soon et al., 2011; Zhang and Woolhouse, 2011; Jeong et al., 2013; Widgren et al., 2015). Natural transmission of *E. coli* O157:H7 between animals occurs directly through the fecal-oral route or indirectly via the farm environment. *E. coli* O157:H7 can survive for extended periods in animal feces and in the farm environment (e.g., cattle drinking water, animal feed, effluents, soil, plants) contributing to the contamination and recontamination of cattle, and ultimately to human infections (Soon et al., 2011). For example, *E. coli* O157:H7 strains have been isolated over a period of 2 years from dairy herds in the USA, and O157:H7 clones have been isolated in a same farm over a period of at least 17 months in England (Shere et al., 1998; Liebana et al., 2005).

The mammalian intestine is the natural habitat of *E. coli* O157:H7 strains. When exposed to extra-intestinal environments, the bacteria must resist against wildly fluctuating environmental stresses to ensure its survival. The persistence and spreading of *E. coli* O157:H7 within farms can be affected by various factors such as microbial interactions (antagonism, competition for nutrients), physicochemical parameters (pH, temperature, solar radiation, rainfall events), physiological parameters (ability of the bacteria to form biofilms, fitness factors supporting persistence) or farming practices (slurry,

manure) (Fremaux et al., 2006; Soon et al., 2011; Jeong et al., 2013; Vogeeler et al., 2015). Overall, persistence and spreading of *E. coli* O157:H7 at the farm level depend on strain type and its ability to survive in the farm environment as well as duration and magnitude of shedding by individual animal (Conedera et al., 2001; Fremaux et al., 2006).

It is important to better understand factors influencing persistence and spreading of *E. coli* O157:H7 at the farm level. In a previous prevalence study, we identified *E. coli* O157:H7 bovine shedders in French slaughterhouses (Bibbal et al., 2015). The farms from which they came from were visited several times in order to detect STEC O157:H7 in cattle. From these sampling campaigns, the isolate *E. coli* O157:H7 MC2 was considered as a persistent strain. In this study, the genome of *E. coli* MC2 was analyzed to i) determine its phylogenetic position among *E. coli* O157:H7 strains and ii) define its virulence properties to estimate the potentiality of the bacteria to cause human illnesses. *E. coli* MC2 was also cultured in different compartments of the bovine gastro-intestinal tract (GIT) to test its capacity to survive during its transit through the bovine gut. The capacity of *E. coli* MC2 to survive and form biofilms in bovine feces was also investigated, and gene expression experiments were performed to analyze the bacterial transcriptional response to stresses potentially encountered outside the animal GIT.

## MATERIALS AND METHODS

### Genome Analysis

The MC2 genome was previously sequenced and the draft genome deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accession number NJDB00000000.1 (Auffret et al., 2017).

The predicted coding DNA sequences (CDS) in MC2 genome were screened for virulence factors using blastn (version 2.2.28+) (with minimum coverage and identity thresholds of 70%) and the Virulence Factors database DNA dataset (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>, release Fri May 27 10:06:02 2016; Chen et al., 2005). The MC2 serotype was confirmed *in silico* using SerotypeFinder (version 1.1; Joensen et al., 2015). The Stx subtype, the occupancy of the *yehV*, *wrbA*, *argW*, and *sbcB* loci, and the Stx-associated bacteriophage insertion (SBI) boundary sequences were first analyzed by PCR amplification (Shaikh and Tarr, 2003; Besser et al., 2007; Auvray et al., 2009) and then confirmed by *in silico* analysis. The SBI genotyping nomenclature (Shringi et al., 2012) was used to design the SBI genotype code of MC2. Phylogrouping was performed as previously described (Clermont et al., 2013). Lineage-specific polymorphism (LSPA-6), based on sequence length polymorphism of six loci (Yang et al., 2004), was also analyzed using *in silico* PCR. LSPA-6 genotypes 111111 and 211111 are assigned to lineage I and I/II strains respectively and all deviations from the genotypes 111111 and 211111 were classified as LSPA6 lineage II (Zhang et al., 2007; Ziebell et al., 2008). The sequences of the O157:H7 strains EDL933 (lineage I) and EC4115 (lineage I/II) (CP001164.1) were used as controls (Zhang et al., 2007; Eppinger et al., 2011). *In silico* probe based method was first used to discriminate clades 1, 2, 3, and 8 independently from 4, 5, 6, 7, and 9 as a group as previously described (Riordan et al., 2008). In a second step, the 23 single

**Abbreviations:** A/E, attaching and effacing; CFU, colony-forming unit; DC, digestive content; EHEC, enterohaemorrhagic *E. coli*; GIT, gastro-intestinal tract; SCFA, Short chain fatty acid; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*.

nucleotide polymorphisms (SNPs) profile (Amigo et al., 2015) was used to compare the genome sequence of MC2 to that of two O157:H7 strains of clade 7 (08-BKT061141 and 09-BKT048303) described by Söderlund et al. (2014). A whole genome phylogenetic analysis based on SNP differences was performed using CSI Phylogeny (version 1.4) (Kaas et al., 2014) from 26 O157:H7 STEC strains isolated from cattle or clinical cases described in Supplementary Table 1. The unrooted circular tree was generated with Seaview version 4.5.4 (Gouy et al., 2010).

## Bacterial Strain Characteristics and Growth Conditions

The O157:H7 *E. coli* strain MC2 was isolated from cattle feces in France (Bibbal et al., 2015). A spontaneous rifampicin-resistant mutant of MC2 (MC2 Rif<sup>R</sup>) was isolated by culturing the wild-type strain on Luria Bertani (LB) agar plates containing rifampicin (100 µg mL<sup>-1</sup>). The reference EHEC O157:H7 strain EDL933 and the bovine commensal *E. coli* strain BG1 (Riley et al., 1983; Bertin et al., 2011) and their spontaneous rifampicin-resistant mutants, EDL933 Rif<sup>R</sup> and BG1 Rif<sup>R</sup> (Bertin et al., 2013) respectively, were used as controls. The growth patterns of MC2 Rif<sup>R</sup>, EDL933 Rif<sup>R</sup> and BG1 Rif<sup>R</sup> were similar to that of parent strains. The enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strain E2348/69 and *E. coli* DH5α were used respectively as a positive and negative controls in the fluorescence-actin staining (FAS) test and in the Vero cell cytotoxicity assay. All *E. coli* strains were routinely cultured in LB broth at 37°C with aeration. The standard biosecurity and safety procedures have been used.

## Animal and Digestive Contents Sampling

Three healthy bulls (Permit number: C6334517) were slaughtered in the experimental slaughterhouse of the “Herbipole” (INRA [National Institute for Agricultural Research] Saint-Genès-Champagnelle, France), in accordance with the guidelines of the local ethics committee and current INRA ethical guidelines for animal welfare (Slaughterhouse Permit number: 63345001). Digestive contents (DC) (small intestine, rumen, caecum, colon and rectum) were collected from these three bulls and two additional cows were used for the collection of feces samples. All the animals were fed a mixed diet containing hay (20%), maize (40%), and concentrate (40%). After being collected, the DC were immediately brought to the laboratory. The small intestine contents were directly distributed in sterile tubes (FALCON) without any particular attention regarding anaerobiosis. The other intestinal contents were processed under strictly anaerobic conditions (Chaucheyras-Durand et al., 2006). Briefly, rumen contents were strained through four layers of cheesecloth to remove large feed particles and were then processed without dilution. Caecum, colon and rectum contents were diluted 1:1 in reduced potassium phosphate (PP) buffer (50 mM potassium phosphate, resazurin 0.1%, 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mM cysteine, pH 7.2). The PP buffer was prepared as follows: the solution was boiled for at least 5 min, cooled under a 100% CO<sub>2</sub> atmosphere for 20 min and finally reduced by addition of cysteine. Rumen, caecum, colon and rectum samples were distributed under a stream of CO<sub>2</sub> in sterile O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>-saturated Hungate tubes to maintain anaerobiosis.

Sensitivity of the intestinal microbiota to rifampicin was confirmed by spotting each digestive content on LB and SMAC agar plates supplemented with 100 µg mL<sup>-1</sup> rifampicin. All these samples, containing the live endogenous microbiota and noted as unfiltered samples, were used for experiments immediately without freezing. Filtered DC samples were obtained by centrifugation (15 min, 10,000 × g) and filtration through a Steritop and then a Stericup system with membrane pore size of 0.45 and 0.22 µm, respectively (Millipore). The sterility of the filtered DC samples was checked by inoculating an aliquot into a LB agar plate. Filtered DC samples were stored at room temperature until use.

## Enumeration of Total Cultivable Bacteria From Digestive Contents

The endogenous microbiota was enumerated for each DC sample from the three bulls. The facultative anaerobes and Gram-negative bacteria were enumerated by spreading 100 µL of DC samples on G20 solid medium agar (Chassard et al., 2008) and SMAC agar plates, respectively. Plates were incubated overnight at 39°C before counting colony-forming unit (CFU). To enumerate the density of strict anaerobes, 10-fold serial dilutions of DC samples were performed in a liquid dilution medium of Halliwell and Bryant (1963) under CO<sub>2</sub> flow. Each dilution (1 mL) was inoculated into O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> Hungate tubes using the complete medium (9 mL) described by Leedle and Hespell (1980). Three Hungate tubes inoculated per dilution were then incubated for 1 week at 39°C under strict anaerobiosis. The most probable numbers of anaerobes were determined with the Mc Grady table (Clarke and Owens, 1983). The presented values are the log<sub>10</sub> mean number of anaerobes mL<sup>-1</sup> ± the standard error of the mean (SEM).

## Incubation of *E. coli* Strains in Digestive Contents

The spontaneous mutants MC2 Rif<sup>R</sup>, EDL933 Rif<sup>R</sup> and BG1 Rif<sup>R</sup> inoculated from a single colony were first incubated in LB broth supplemented with rifampicin (100 µg mL<sup>-1</sup>) for 7 h at 37°C with aeration. The pre-cultures were then 50-fold diluted in filtered DC samples and grown overnight at 39°C without aeration. The next day, the bacterial concentration was monitored spectrophotometrically at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) and adjusted before inoculating ≈10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup> in unfiltered DC samples (5 mL each). The DC samples were then incubated at 39°C (internal bovine temperature) under strictly anaerobic conditions with gentle shaking (rumen samples) or without shaking (caecum, colon and rectum samples). Small intestine contents were incubated without any particular attention regarding anaerobiosis and without shaking in order to limit the oxygen supply (oxygen-limited conditions). These conditions (temperature, shaking and oxygenation) were chosen to reflect the *in vivo* conditions for each digestive compartment (Chaucheyras-Durand et al., 2010; Bertin et al., 2011). At each time point, unfiltered DC samples were serially diluted 10-fold in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, spotted on SMAC agar plates supplemented with rifampicin (100 µg mL<sup>-1</sup>) and

incubated overnight at 37°C before bacterial enumeration. Each experiment was replicated at least three times with each DC samples collected once on the three animals. The presented values are the  $\log_{10}$  mean number of CFU  $\text{mL}^{-1} \pm \text{SEM}$ .

### Incubation of *E. coli* Strains in Feces Samples and M9 Minimal Medium

Feces collected from two cows were pooled and diluted 1:1 (w/v) in PBS buffer (pH 7.2). Unfiltered feces were directly distributed in sterile tubes (FALCON) and immediately used for experiments. Sensitivity of the feces microbiota to rifampicin was confirmed as described above. To obtain sterile samples, the feces were centrifuged and filtered as described above for DC samples. Filtered fecal suspensions were stored at +4°C until use. Feces samples (filtered and unfiltered) and M9 minimal medium supplemented with glucose (40 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (0.1 mM) and trace metals (M9-Glc) (5 mL each) were inoculated with  $\approx 10^4$  and  $10^7$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$ , respectively, and incubated at 15°C in a refrigerated thermostat (RML6 Lauda) without shaking. At each time point, the bacterial concentration was monitored in feces samples diluted in PBS and spotted on SMAC agar plates supplemented with rifampicin (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (unfiltered feces samples) or without antibiotic (filtered feces samples) as described above. The bacterial concentration in M9-Glc was quantified spectrophotometrically ( $\text{OD}_{600}$ ). Each experiment was replicated at least three times with feces samples collected at three independent days. The presented values are the  $\log_{10}$  mean number of CFU  $\text{mL}^{-1} \pm \text{SEM}$ .

### Short Chain Fatty Acids (SCFA) Analysis

Short chain fatty acids (SCFAs) concentration was quantified in DC samples before and after incubation. Briefly, the samples were centrifuged (10,000  $\times g$  for 10 min), the supernatants were filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) and 30  $\mu\text{L}$  of orthophosphoric acid (75%) were added to 1 mL of supernatant. Total SCFA concentrations were determined by gas chromatography performed by AFYREN INVESTMENT (Biopole Clermont Limagne, Saint Beauzire, France). pH was measured using a HI-8424N pH meter (HANNA instruments). The presented values are the mean ( $\pm \text{SEM}$ ) of independent measures in DC samples from the three animals.

### Vero Cell Cytotoxicity Assay

Vero cells were seeded at  $5 \times 10^3$  Vero cells per well on 96-well microplates and cultivated for 24 h in Dulbecco's Minimum Essential Medium (1X) containing non-essential amino acids (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, UK), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco<sup>®</sup>, South America) at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Bacteria were successively cultured in LB broth at 37°C overnight and in LB broth supplemented with 200 mM of mitomycin C (to increase the production of Shiga toxin) at 37°C for 16 h. A volume of 2 mL of bacterial culture containing  $10^9$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$  adjusted with LB broth was centrifuged at 6,000  $\times g$  for 5 min at +4°C. The supernatant was filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore-size membrane filter (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and serially diluted (1:4) with PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). The interaction was performed by adding 10  $\mu\text{L}$  of each dilution to each well containing Vero cells. After 72 h of interaction at 37°C, the cells were washed

three times with Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min, and then washed with 100  $\mu\text{L}$  of PBS three times and 100  $\mu\text{L}$  of 0.01 M Tris-HCl, pH 8.5. The fixed cells were then stained with 100  $\mu\text{L}$  of 1% methylene blue in Tris-HCl for 45 min, washed again with 100  $\mu\text{L}$  distilled water and 100  $\mu\text{L}$  of Tris-HCl, and finally dried overnight. The methylene blue was extracted with 100  $\mu\text{L}$  of 0.1 M HCl by shaking. After 15 min of extraction, 75  $\mu\text{L}$  of cells were transferred to new 96-well microplates and the color density of each well was measured by TECAN microplate reader (Infinite M200) at 660 nm. All assays were repeated twice independently.

### Fluorescent-Actin Staining (FAS) Test

Bacteria were inoculated in LB broth and incubated at 37°C overnight. HeLa cells were seeded at  $3.7 \times 10^4$  cells per well on Lab-Tek 8 chamber slides (Nunc) and incubated for 24 h in the same conditions as those of Vero cells. HeLa cells were washed three times with preheated Hank's Balanced Salt Solution (37°C). The interaction was done in 500  $\mu\text{L}$  of Dulbecco's Modified Eagle's medium buffered with 25 mM HEPES complemented with 5% FCS, with a starting inoculum of  $10^2$  bacteria per HeLa cell. After 6 h of interaction at 37°C, the cells were washed six times with Hank's Balanced Salt Solution, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, and then permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 5 min. Fluorescent-actin was labeled with Rhodamine-phalloidin (Molecular Probes<sup>®</sup>) in accordance with the manufacturer's instructions.

### Biofilm Formation Assay

*E. coli* strains inoculated in LB broth (2 mL) from a single colony were incubated for 7 h at 37°C with aeration. The cultures were then diluted (1:50) in filtered feces and M9-Glc, and incubated 24 h at 39°C with gentle shaking (100 rpm). The next day, the cultures were diluted (1:100) in filtered feces and M9-Glc respectively and 200  $\mu\text{L}$  of bacterial cultures were incubated in triplicate in 96-well polystyrene plate (FALCON). For all biofilm assays, the biofilm-positive strain EDL933 was used as positive control, and wells filled with 200  $\mu\text{L}$  sterile feces or M9-Glc were used as blank values. After incubation of the plates during 6 h, 1, 2, and 3 days at 39°C, and 1, 3, and 7 days at 15°C, unattached cells were removed by washing with Tryptone Salt medium (1 g  $\text{L}^{-1}$  Bacto Trypton and 8.5 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl). Biofilms were fixed with 100% ethanol for 20 min, the plates were dried for 30 min at room temperature, and the biofilms were stained with crystal violet (0.1%) for 10 min. The crystal violet solution was removed, and the biofilms were washed three times with water. The stain was released with 150  $\mu\text{L}$  of 33% acetic acid. Biofilms were quantified by measuring the absorbance at 595 nm (OD) with a microplate reader (TECAN). Blank values were subtracted from values obtained after bacterial incubation. The strains were classified as previously described: strong ( $\text{OD}_{595} > 0.6$ ), medium ( $0.6 > \text{OD}_{595} > 0.3$ ), or weak ( $0.3 > \text{OD}_{595} > 0.1$ ) biofilm formers or as non-biofilm formers ( $\text{OD}_{595} < 0.1$ ) (Vogeleer et al., 2015). The presented values are the mean of three independent experiments  $\pm \text{SEM}$ .



## RNA Extraction

RNA samples were collected when the bacterial strains reached the stationary growth phase in filtered feces samples (7 days) and M9-Glc (30 h). Bacterial suspensions were centrifuged (4,500 × g for 20 min), the supernatants were stored at −20°C for further investigations and the bacterial pellets were flash frozen in liquid nitrogen and rapidly stored at −80°C. The next day, the bacterial pellets were resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) in 2 mL Graduated Skirted tube with tethered screw cap (BioSpec) containing 600 mg 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Biospec), 1 volume of AquaPhenol™ (pH 4.5) (MP Biomedicals), 1/10 volume of 10% Sodium Dodecyl Sulfate, and 3.5 μL β-mercaptoethanol (PROLABO). The lysis of bacterial cells was performed using a FastPrep®-24 instruments twice for 30 s with a speed of 6 m/s. Total RNA were purified from the bacterial pellet using the Nucleospin® RNA (Marcherey Nagel) according to the manufacturer recommendations and treated twice with 0.5 μL Turbo DNA-free™ kit (Invitrogen) for 30 min at 37°C to remove genomic DNA. To assess DNA contamination, PCR control on each sample was performed using the *tufA* primers (Supplementary Table 2). The RNA concentration was measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop technologies, France) and the quality of RNA was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, France) (the high quality of each RNA samples was confirmed with 23S/16S rRNA ratio ≈ 2 and a RNA Integrity Numbers ≥ 8).

## Relative RT-qPCR

One microgram of each RNA sample was reverse transcribed as previously described (Bertin et al., 2011). Quantitative PCR runs were carried out using the Mastercycler ep realplex apparatus (Eppendorf) as previously described (Bertin et al., 2011). Amplification conditions were as follows: 95°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 20 s. The relative mRNA quantification was performed using primer pairs described in Supplementary Table 2. Triplicate samples were amplified in each case. Data were normalized using the *tufA* gene as an internal control. Results were calculated using the comparative cycle threshold method. The results presented are averages of the results from at least triplicate experiments ± SEM. Genes showing a >2-fold change in expression were considered to be differentially regulated.

## Statistical Analysis

Statistical analyses of the results obtained during incubation of *E. coli* strains in bovine digestive contents and biofilm formation experiments were performed using the two-way ANOVA with the Bonferroni *post-hoc* test and the one-way ANOVA with the Tukey *post-hoc* test, respectively.

For RT-qPCR analysis, fold-changes were considered as significantly different at  $p < 0.05$  (Student's *t*-test).

## RESULTS

### Genome Analysis

We first analyzed the MC2 genome (i) to identify the genes encoding virulence factors (VFs) and proteins involved in biofilm

formation and (ii) to determine the phylogenetic position of *E. coli* MC2 among *E. coli* O157:H7 strains.

### Virulence Factors

A total of 283 VFs encoding genes previously described among pathogenic *E. coli* were identified in the MC2 genome (Supplementary Table 3). In addition to the locus of enterocytes effacement (LEE) and the Stx toxins, these genes encode the components of adherence systems, iron acquisition systems, secretion systems or proteins involved in biofilm formation.

### Locus of enterocytes effacement

At least 40 genes belonging to the LEE, which encoded proteins required for A/E lesions, were identified in the MC2 genome. The LEE of *E. coli* MC2 encoded intimin (*eaey* allele), the Tir intimin-receptor (*tir*) involved in intimate attachment of the bacteria to the host cells and the type III secretion system (T3SS) required to inject Tir directly into the cytosol of the host cells. *E. coli* MC2 harbored the *tir* 255T allele.

### Toxins

*E. coli* MC2 possessed the genetic information coding for both Stx1a and Stx2c toxins (one copy of each gene). The integration site for the *stx1a*- and *stx2c*-bacteriophages in *E. coli* MC2 was identified in *yehV* and *sbcB* loci, respectively (YS12c SBI genotype code). The MC2 genome carried the *Q*<sub>933</sub> anti-terminator allele that regulates expression of the gene *stx2*. In addition to *stx*, the MC2 genome harbored the genetic information required for the synthesis of EHEC-hemolysin (*hlyABCD*).

### Adherence and iron acquisition

In addition to intimin, the MC2 genome carried 44 genes coding for the synthesis of 14 adherence systems identified among pathogenic *E. coli* strains (Table 1). Most of these structures (fimbriae or non-fimbriae) are known to adhere *in vitro* to intestinal cell lines (T84, HT29 or Caco-2; Table 1). The MC2 genome also carried genes coding for the production of flagellum (*fli* and *flg* operons), known to possess adhesive properties, and iron acquisition systems (*entABCDEFGHI*, *fepABCDEG*, *fes*, *chuA*, and *hma*; Supplementary Table 3).

### Secretion systems, effectors and biofilm formation

In addition to the T3SS encoding genes included in the LEE, the MC2 genome shared the genetic information coding for proteins belonging to the secretion systems ETT2, T2SS, and T6SS (Supplementary Table 3). The type II secretion system (T2SS) (*etp* operon) is required for the secretion of the metalloprotease StcE, also encoded by the MC2 genome. *E. coli* MC2 carried the genes encoding (i) the type III secretion system 2 (ETT2) (*etrA*, *epaOPQS*, *eprIJK*, *eivACEFGJ*) and (ii) Hcp (hemolysin co-regulated protein), VgrG (valine-glycine repeat protein G) and additional proteins constituting the type VI secretions system (T6SS) (Supplementary Table 3). In addition, the MC2 genome encoded 22 non-LEE-encoded (Nle) effectors (Supplementary Table 3). As shown in Table 1, the majority of the genes coding for adherence systems in the MC2 genome are known to be involved in biofilm initiation (11 of 14). Additionally, the genes required for the synthesis of

**TABLE 1** | Adherence systems encoded by the *E. coli* MC2 genome.

Adherence system	Gene or gene cluster	<i>In vitro</i> cell adherence <sup>a</sup>	Receptor	Biofilm formation	References
Cah (calcium binding antigen 43 homolog)	<i>cah</i>	NA <sup>b</sup>	Calcium	Yes	Torres et al., 2002
Curli	<i>csgABCDEFG</i>	T84	Matrix and plasma proteins	Yes	McWilliams and Torres, 2014
ECP ( <i>E. coli</i> common pilus)	<i>ecpRABCDE</i>	HT29, Hep-2, HeLa, HTB-4	Arabinosyl residues	Yes	Rendón et al., 2007
EhaA autotransporter	<i>ehaA</i>	Primary bovine epithelial cells (terminal rectum)	Unknown	Yes	Wells et al., 2009
EhaB autotransporter	<i>ehaB</i>	NA <sup>b</sup>	Collagen I, Laminin	Yes	Wells et al., 2009
ELF ( <i>E. coli</i> laminin-binding fimbriae)	<i>ycbQRST</i>	HT29, Hep-2, MDBK	Laminin	ND <sup>c</sup>	McWilliams and Torres, 2014
EspP (Extracellular serine protease)	<i>espP</i>	T84, Bovine primary rectal epithelial cells	Unknown	Yes	Puttamreddy et al., 2010 Dziva et al., 2007
F9 fimbriae	Z2200- Z2206	EBL, HeLa	Bovine fibronectin Galβ1-3GlcNAc	Yes	McWilliams and Torres, 2014
FdeC (EaeH)	<i>eaeH</i>	UM-UC-3, Caco-2, CHO, HeLa, Vero	Unknown	Yes	Easton et al., 2014
HCP (Haemorrhagic coli pilus)	<i>hcpABC</i>	T84, Caco-2, HeLa, Hep-2, HT-29, MDBK, cow colon explants	Laminin, fibronectin	Yes	Xicohtencatl-Cortes et al., 2007
Iha	<i>iha</i>	HeLa, MDKB	Unknown	ND	Tarr et al., 2000
Nlpl lipoprotein	<i>nlpl</i>	HBMECs, Intestine-407	Unknown	ND	Teng et al., 2010
T1P (Type I pili)	<i>fimBE</i> , <i>fimAICDFGH</i>	HeLa, REC, Colonic, and ileal enterocytes	Mannose	Yes	McWilliams and Torres, 2014
UpaG (EhaG) autotransporter	<i>upaG (ehaG)</i>	T24	Fibronectin, Laminin	Yes	Totsika et al., 2012

<sup>a</sup>Cell lines: Caco-2, human colon carcinoma; CHO, Chinese hamster ovary; EBL, embryonic bovine lung; HBMECs, human brain microvascular endothelial cells; HeLa, human cervix epithelial carcinoma; Hep-2, epithelial cells from epidermoid carcinoma of the human larynx; HT29, human colorectal adenocarcinoma; HTB-4, human bladder transitional carcinoma; Intestine-407, human cervical adenocarcinoma, HeLa derivative; MDBK, Madin-Darby bovine kidney; REC, human B cell lymphoma; T24, human bladder transitional carcinoma; T84, human colonic adenocarcinoma; UM-UC-3, human bladder carcinoma; Vero, kidney epithelial cells from an African green monkey.

<sup>b</sup>No adherence to the cell lines tested.

<sup>c</sup>Not determined.

exopolysaccharides (colanic acid [*wca* gene cluster], poly-β-1,6-GlcNAc (PGA) [*pga* gene cluster], cellulose [*bcs* gene cluster]) and T6SS present in the MC2 genome are also involved in biofilm formation.

### Classification, Phylogenetic, and Genome Signature Analyses

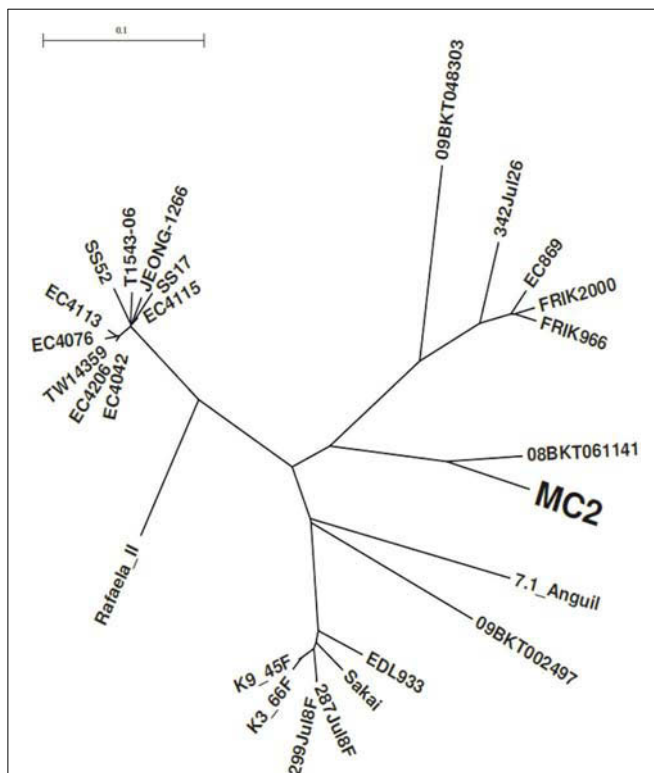
Phylogenetic grouping (A, B1, B2, C, D, E and F), lineage (I, II, I/II), and clade (1–9) classifications are currently used to analyze the evolution of O157:H7 *E. coli* strains among different hosts (human and animals) and different countries. *In silico* analysis identified MC2 as phylo-group E, lineage II [based on its LSPA-6 genotype (213111)] and clade 7 *E. coli* strain.

A phylogenetic tree was constructed using a set of 26 genome sequences of *E. coli* O157:H7 strains isolated from cattle and clinical cases (Supplementary Table 1). The tree segregates into three major branches. All the clade 7 bovine strains ( $n = 6$ ) were clustered in the same major branch whereas bovine and human isolates are inter-mixed into the two remaining branches (Figure 1). Consistent with

lineage and LSPA-6 classification, the closest relative strain to MC2 was the STEC 08-BKT061141 with a subtype that dominates in Swedish cattle reservoir (Söderlund et al., 2014). As expected, *E. coli* MC2 and 08-BKT061141 possessed identical genetic characteristics (*stx1a* and *stx2c* subtypes, SNPs in *tir*, ECs2357, *fimH* and *agaF* genes, intact *wrbA* site). In depth analysis of the MC2 genome also revealed that premature codon stops in *eutA* and *luxR*, and the absence of deletions in *bcs* and *lsr-tam* operons were absent in the MC2 genome.

### Stx-Associated Toxicity and A/E Lesion Formation due to *E. coli* Strain MC2

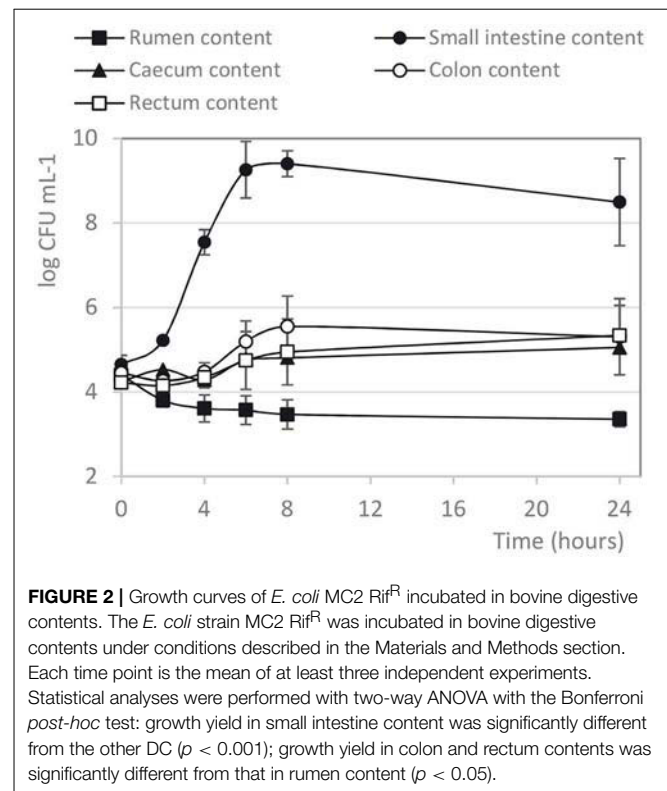
*E. coli* MC2 was tested for the production of toxin Stx (toxicity to Vero cells) and formation of attachment and effacement (A/E) lesions (FAS test), two crucial steps in human EHEC infections. Results analysis showed that the *E. coli* strain MC2 displayed toxicity toward Vero cells (Supplementary Figure 1) and produced A/E lesions on cultured HeLa cells as determined by accumulation of filamentous actin at the sites of adhesion (Supplementary Figure 2).



**FIGURE 1** | Phylogenetic tree highlighting the position of *E. coli* MC2 relative to other *E. coli* O157:H7 strains. The whole genome SNP based phylogeny was established with CSI phylogeny version 1.4 using EDL933 (AE005174.2) as a reference and standard input parameters (see the Materials and Methods section). The unrooted circular tree was generated with Seaview (version 4.5.4.).

## Growth or Survival of *E. coli* MC2 in Bovine Digestive Contents

The capacity of *E. coli* MC2 Rif<sup>R</sup> to survive through the bovine intestinal tract was analyzed by incubating the bacteria into different digestive contents (DC) collected from rumen, small intestine, caecum, colon and rectum (Figure 2). The spontaneous rifampicin-mutant of the EHEC reference strain EDL933 (control strain) was also included in this study. *E. coli* MC2 Rif<sup>R</sup> was able to grow in all the digestive compartments except the rumen (Figure 2). In the rumen samples, a 1 log CFU mL<sup>-1</sup> decrease in the MC2 population was observed after 4 h of incubation and the strain survived for up to 24 h at low level ( $\approx 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>) (Figure 2). In contrast, MC2 Rif<sup>R</sup> grew at high level (5 log CFU mL<sup>-1</sup> increase) in small intestinal contents, and remained at high concentration up to 24 h. The growth yield of MC2 Rif<sup>R</sup> in small intestine contents was significantly more important than in the other DC samples ( $p < 0.001$ ; Figure 2). In the other DC, MC2 Rif<sup>R</sup> population increased from 4 to 8 h and then remained rather stable up to 24 h ( $\approx 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>). Similar results were obtained with *E. coli* EDL933 Rif<sup>R</sup> (data not shown). Differences were observed in the pH value of the different DC at the time of inoculation (T0) (Table 2), with rumen more acidic than the other intestinal compartments. Total SCFAs were also



**FIGURE 2** | Growth curves of *E. coli* MC2 Rif<sup>R</sup> incubated in bovine digestive contents. The *E. coli* strain MC2 Rif<sup>R</sup> was incubated in bovine digestive contents under conditions described in the Materials and Methods section. Each time point is the mean of at least three independent experiments. Statistical analyses were performed with two-way ANOVA with the Bonferroni *post-hoc* test: growth yield in small intestine content was significantly different from the other DC ( $p < 0.001$ ); growth yield in colon and rectum contents was significantly different from that in rumen content ( $p < 0.05$ ).

much higher in the rumen than in the lower gut contents before incubation (T0) (Table 2), acetate being the main SCFA present ( $72.7 \pm 7.8$  mM acetate,  $13.9 \pm 1.2$  mM propionate and  $14.8 \pm 2.0$  mM butyrate were found in the rumen at T0). After 24 h incubation in the presence of MC2 Rif<sup>R</sup>, the SCFA concentration increased in the DC indicating fermentative activity (data not shown). For example, in the rumen, after 24 h incubation, the concentrations of acetate, propionate and butyrate were  $116.2 \pm 11.3$  mM,  $24.1 \pm 2.2$  mM and  $30.1 \pm 5.3$  mM, respectively.

## Survival of *E. coli* MC2 in Bovine Feces

To test the persistence of *E. coli* MC2 outside the animal digestive ecosystem, we first analyzed the growth of MC2 Rif<sup>R</sup> in feces samples during incubation at 15°C (inoculation at  $\approx 4$  log CFU mL<sup>-1</sup>). The growth of EDL933 Rif<sup>R</sup> and the rifampicin-resistant mutant of the bovine commensal *E. coli* BG1 was also analyzed in the same conditions. The average concentration of the endogenous fecal microbiota was  $\approx 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> at the start of the study. As shown in Figure 3, the bacterial concentration increased slightly during the first day of incubation (5–6 log CFU mL<sup>-1</sup> were enumerated up to 6 days post-inoculation for the three strains tested) and then decreased to reach  $\approx 10^3$ – $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> after 3 weeks of incubation. The growth of MC2 Rif<sup>R</sup> was very similar to that of *E. coli* EDL933 Rif<sup>R</sup> (Figure 3). The commensal *E. coli* BG1 Rif<sup>R</sup> showed slightly higher concentration all along the incubation (Figure 3).

**TABLE 2** | Anaerobic bacteria counts, pH values and SCFA concentrations in the digestive contents before incubation (T0).

	Rumen	Small intestine	Caecum <sup>a</sup>	Colon <sup>a</sup>	Rectum <sup>a</sup>
pH	6.22 ± 0.17	7.29 ± 0.14	6.80 ± 0.08	6.69 ± 0.09	6.68 ± 0.06
Total SCFAs (mM)	105.5 ± 11.3	15.9 ± 4.6	30.3 ± 16.4	15.3 ± 11.8	14.8 ± 11.3
Log <sub>10</sub> (anaerobes)	10.85 ± 0.19	8.56 ± 0.84	9.24 ± 0.16	9.41 ± 0.24	9.18 ± 0.00

Values are the mean of measurements in digestive contents from three different animals ± SEM.

<sup>a</sup>These contents were diluted before inoculation (see Materials and Methods).

## Biofilm Formation in Bovine Feces

We analyzed biofilm formation kinetics in filtered bovine feces during 3 and 7 days at 39°C and 15°C respectively. The results showed that *E. coli* MC2 was able to produce strong biofilms in filtered bovine feces at 15°C after 3 days of incubation but was unable to form biofilms at 39°C whatever the time of incubation (Figure 4). Similarly to *E. coli* MC2, EHEC EDL933 also formed strong biofilms in fecal juice at 15°C but was only a weak biofilm producer at 39°C. Interestingly, *E. coli* MC2 was able to form significantly stronger biofilms than commensal *E. coli* BG1 in feces incubated at 15°C at 3 days of incubation (Figure 4). Biofilm formation was also analyzed during incubation of the bacterial strains in M9 minimal media supplemented with glucose (M9-Glc). In contrast to EHEC EDL933, *E. coli* MC2 did not form biofilms at 39°C and weakly produced biofilms (OD<sub>595</sub> < 0.3) at 15°C during incubation in M9-Glc (data not shown).

## Transcriptomic Response of *E. coli* MC2 to Stresses in the Bovine Fecal Environment

To investigate the potential factors involved in the persistence of *E. coli* MC2 outside the bovine GIT, the expression change of key stress fitness genes was quantified during incubation of *E. coli* MC2 in bovine feces under conditions mimicking extra-intestinal environment. The genes were selected among the large panel of genes involved in the ability of *E. coli* to survive stresses (nutrient starvation, high osmolarity, fluctuations in temperature, low pH; Supplementary Table 4). Gene expression experiments were performed using RNA collected during the stationary growth phase (7 days of incubation) of *E. coli* MC2, EDL933, and BG1 incubated in filtered bovine feces (Supplementary Figure 3) relative to M9-Glc (see the Materials and Methods section).

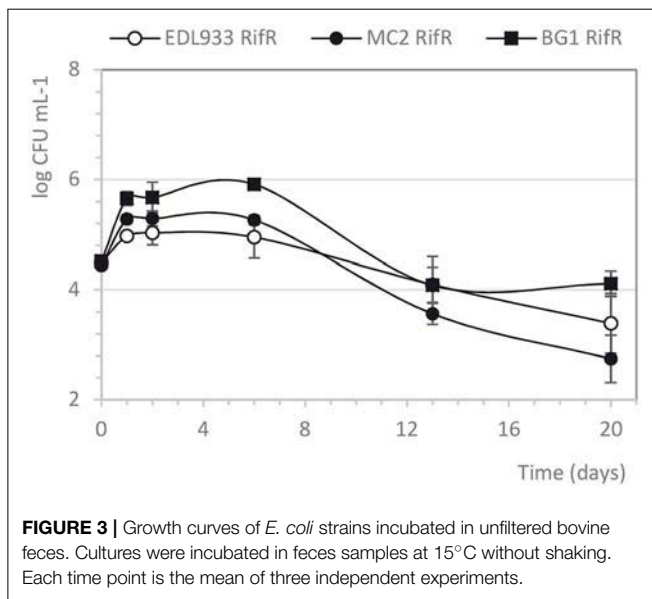
Among the 49 genes tested, *cspA*, *ghoT*, *htrA*, *hicB*, *hicA*, and *ecnA* were significantly up-regulated in *E. coli* MC2 during its incubation in bovine fecal juice when compared to M9-Glc (fold change >2; *p* < 0.05; Figure 5). Interestingly, the genes *ghoT*, *hicA* and *ecnA* encoding proteins that are part of the GhoT/GhoS, HicA/HicB or EcnB/EcnA toxin/antitoxin (TA) systems were significantly up-regulated in bovine feces at 15°C. Note that *ghoT* (toxin-encoding gene) but not *ghoS* (antitoxin-encoding genes) was up-regulated in *E. coli* MC2 (Figure 5). As shown in Figure 5, *ecnA* (antitoxin encoding gene) was up-regulated whereas the transcription of *ecnB* (toxin encoding gene) was not induced in *E. coli* MC2.

To broaden these results, the transcription of the stress fitness genes up-regulated in *E. coli* MC2 was also analyzed in *E. coli*

EDL933 (EHEC reference strain) and BG1 (bovine commensal strain). Significant differences in gene expression were observed since, in contrast to *E. coli* MC2, (i) the genes *ghoT* and *ecnA* were down-regulated and (ii) the transcription of *htrA*, *hicA* and *hicB* was not significantly altered in both BG1 and EDL933 *E. coli* strains (Figure 5). Note that (i) similarly to *E. coli* MC2, the gene *cspA* was up-regulated in *E. coli* BG1 and EDL933 but a significant higher fold-change increase was observed in *E. coli* MC2 and (ii) the stress fitness genes expression patterns of *E. coli* BG1 and EDL933 were close to each other and more distant from that of *E. coli* MC2 (Figure 5).

## DISCUSSION

*E. coli* O157:H7 can persist for extended periods in farm environment constituting a risk of cattle contamination. However, bacterial factors and mechanisms that contribute to the persistence of the pathogen outside the bovine intestine remain still poorly understood. With this in mind, we have selected the *E. coli* O157:H7 strain MC2, found to be persistent in farm environment, to attempt to gain insight into mechanisms used by EHEC to transit through the bovine GIT and resist against adverse extra-intestinal conditions. *E. coli* MC2 is potentially pathogen since the bacterium (i) harbored the genes encoding Stx1 and Stx2 toxins (eukaryotic cells apoptosis) and EHEC-hemolysin (lysis of microvascular endothelial cells) and (ii) displayed toxicity to Vero cells and produced A/E lesions. All these characteristics are involved in intestinal damages, bloody diarrhea and/or HUS during human infections. Furthermore, *E. coli* MC2 also possessed the genetic information encoding additional virulence factors closely associated with virulent O157:H7 clinical strains. Similarly to the vast majority of human clinical isolates, *E. coli* MC2 harbored the *tir* 255T allele and the Q<sub>933</sub> anti-terminator variant, a marker of STEC strains with high toxin production (Ahmad and Zurek, 2006; Mellor et al., 2012). The strain MC2 is assigned to the phylo-group D, closely associated with human clinical *E. coli* O157:H7 strains, whereas the phylo-group B1 is prevalent among commensal *E. coli* in the herbivorous hosts (Ziebell et al., 2008; Tenaillon et al., 2010). Importantly, *E. coli* MC2 also possessed the genetic background required for the biosynthesis of flagella (arrival of bacteria to suitable surfaces), type VI secretion system (proteins export) and extracellular matrix (interactions of the bacteria with the surface) involved in biofilm production (Aschtgen et al., 2008; Kapitein and Mogk, 2013; Zhou et al., 2015). Note that the type VI secretion system has also been recently described as contributing

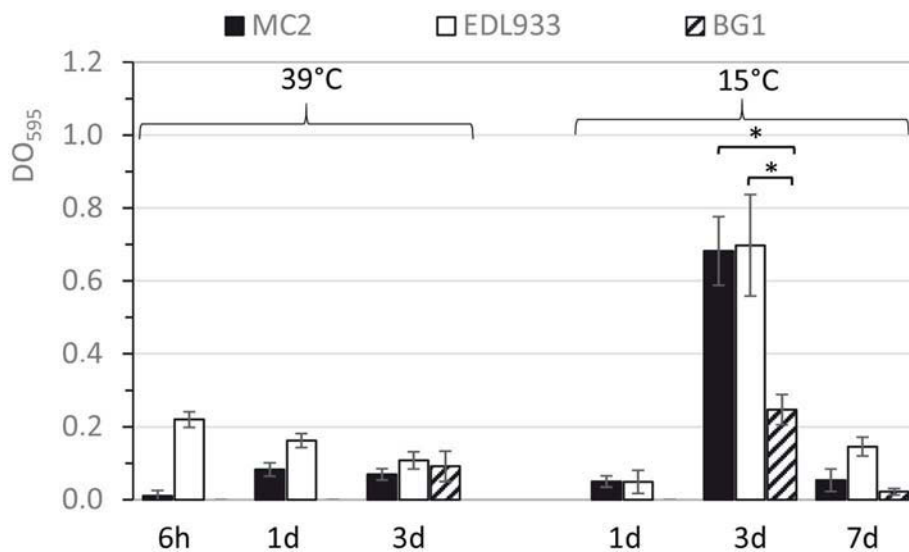


to EHEC virulence (Wan et al., 2017). In addition, the type III secretion system required for A/E lesion formation, can also be exploited by the bacteria to inject Nle effectors into human cells, known to counterbalance the inflammatory response of infected enterocytes (Pearson and Hartland, 2014).

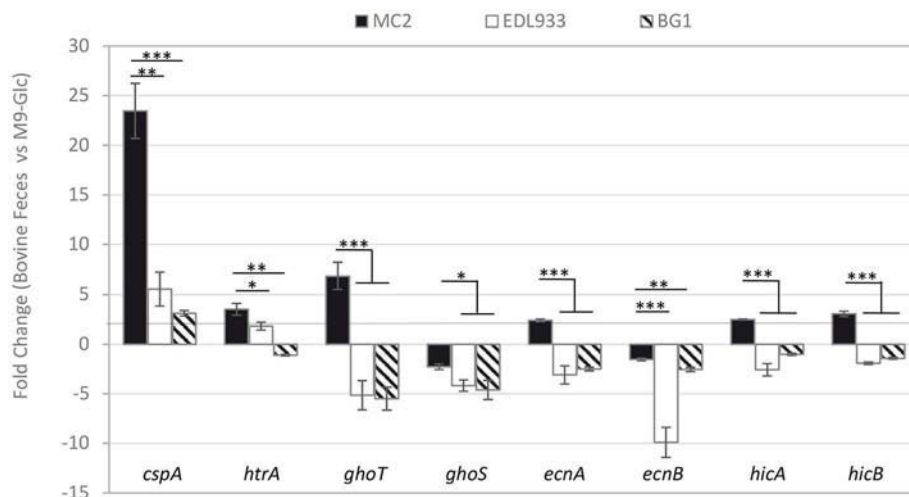
A gene polymorphism analysis was conducted as previously described (Eppinger et al., 2011). The results identified *E. coli* MC2 as a strain related to O157:H7 strains involved in human clinical cases. The *E. coli* strain MC2 was found to be a lineage II (LSPA-6 genotype 213111) and clade 7 bacterial strain. Lineage and clade classification of French bovine or human O157:H7 isolates is poorly documented. However, the LSPA-6 genotype 213111 corresponds to a major subtype among cattle and human O157:H7 isolates in Sweden (Söderlund et al., 2014). In Japan, clade 7 isolates are prevalent among clinical *E. coli* O157:H7 (52%) (Ogura et al., 2015). Clade 7 *E. coli* strains are also prevalent among O157:H7 isolates in Australia (70 and 90% of the cattle and human isolates respectively; Mellor et al., 2012). These observations showed that *E. coli* MC2 was related to clinical O157:H7 isolates widespread across several countries and continents. To persist in the farm environment *E. coli* O157:H7 must maintain a dual lifestyle for surviving inside and outside the bovine GIT. In this study, we showed that *E. coli* MC2 survives in rumen fluids and grows in the content of posterior digestive compartments *in vitro*, predicting a successful transit of the bacteria along the bovine digestive tract. The lack of MC2 growth in the rumen contents might be due to specific physiochemical conditions in this compartment (such as high SCFA concentration), nutrients competition with commensal bacteria and/or to the secretion of inhibitory molecules by the ruminal microbiota (Chaucheyras-Durand et al., 2006). Otherwise, *E. coli* MC2 also survived in bovine feces for a long time despite nutritional competition with the large bacterial endogenous population and adverse environmental conditions (low temperature, non-renewal of nutrients). This suggested that

the bacteria colonize specific ecological niches and/or express specific mechanisms to resist against nutrient starvation and environmental stresses.

The persistence of *E. coli* O157:H7 in the farm environment is due, at least in part, to its ability to colonize the bovine GIT as well as biotic or abiotic surfaces outside the bovine intestine. Importantly, EHEC strains must produce adhesins to first bring the bacteria closer to the host intestinal epithelia and then establish intimate attachment and produce A/E lesions (McWilliams and Torres, 2014). *E. coli* MC2 possessed the genetic information encoding fourteen adherence systems known to bind to distinct specific receptors. Some of these adhesins possessed properties related to the bovine gut: (i) the F9 fimbriae are involved in calves colonization, (ii) the EhaA and EspP autotransporters adhere *in vitro* to primary bovine rectal epithelial cells, (iii) the HCP pilus is required for the adherence of the bacteria to bovine gut explants, and (iv) FdeC (EaeH) is expressed at 39°C, the internal bovine temperature, but not at 37°C (Dziva et al., 2004; Easton et al., 2014; McWilliams and Torres, 2014). Furthermore, the Q<sub>933</sub> anti-terminator involved in *stx2* regulation, is probably indirectly involved in bovine intestinal colonization since the production of Stx2 (not cytotoxic to bovine enterocytes) enhances *E. coli* O157:H7 colonization of cattle intestinal tissues (Baines et al., 2008). In addition, the tip protein FliD included in H7 flagella, mediates the adhesion of *E. coli* O157:H7 to bovine rectal epithelium (Mahajan et al., 2009). Noteworthy, EhaB, ELF, HCP, and UpaG bind to laminin, an extracellular matrix present in the mammalian intestine that promotes bacterial adhesion to host tissues (Simon-Assmann et al., 2010; McWilliams and Torres, 2014). In addition to these adherence systems, the metalloprotease StcE could play an important role in bacterial colonization of the bovine gut. Indeed, StcE, only secreted by pathogenic *E. coli*, is required to cleave the protein backbone of the mucin glycoproteins recovering the host enterocytes and contributes to efficient intimate adherence of the bacteria to host epithelium (Hews et al., 2017). The large number of colonization factors that bind to distinct host receptors reflects the capacity of *E. coli* MC2 to colonize different segments of the bovine GIT. Iron acquisition, essential for bacterial growth, plays also an important role in *E. coli* gut colonization. *E. coli* MC2 has the potentiality to scavenge iron by the mean of siderophore enterobactin and to cleave cyclic enterobactin into linear enterobactin by the mean of the Fes esterase, thus allowing the release of iron into the bacterial cytoplasm (Braun, 2003). In addition, the ChuA haem-binding receptor is synthesized by the bacteria in response to iron limitation and the Hma receptor promotes haemin uptake independently to ChuA (Torres and Payne, 1997; Hagan and Mobley, 2009). The redundancy of genes encoding haem-receptors in the MC2 genome suggests an important role of haemin and/or hemoglobin as iron source. As described above, the MC2 genome shared the genes encoding the production of EHEC-hemolysin that is able to lyse red blood cells and increase hemoglobin concentration *in vivo*. In fact, the capacity of *E. coli* to produce hemolysis coupled with the ability to transport haem from hemoglobin, result in an efficient iron acquisition mechanism for pathogens responsible for hemolytic lesions. As a comparison, the genome of the commensal strain



**FIGURE 4** | Biofilm formation kinetic of *E. coli* strains on polystyrene surface when incubated in filtered bovine feces. *E. coli* strains were incubated up to 3 and 7 days at 39 and 15°C, respectively. The differences in biofilm formation between the MC2 and BG1 strains were determined by ANOVA with the Tukey *post-hoc* test ( $p < 0.05$ ).



**FIGURE 5** | Relative expression levels of stress fitness genes during incubation of *E. coli* O157:H7 MC2 and EDL933, and bovine commensal *E. coli* BG1 in filtered bovine feces in comparison with M9-Glc. Results are average fold changes in expression, with SEM from at least three independent values. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

BG1 only shared the genetic information coding for enterobactin (Segura et al., 2017).

Phenotype characteristics can also be considered as biomarkers to identify differences in *E. coli* O157:H7 environmental persistence (Mukherjee et al., 2008; Franz et al., 2011). In the present study, the vast majority of the adherence systems encoded by the MC2 genome is involved in the early stages of biofilm formation. Biofilm production, known to protect attached bacteria from desiccation, UV radiation and other environmental stresses, is considered as a survival strategy used by the bacteria in hostile environments (Puttamreddy

et al., 2010; Yaron and Römling, 2014; Vogeleeer et al., 2015). For example, the operons *csgDEFG* and *csgBAC* encoded the synthesis of curli fimbriae that are required by *E. coli* O157:H7 for adhesion to biotic and abiotic surfaces and biofilm formation under conditions encountered in extra-intestinal environments (e.g., low temperature, nutrient limitation; Sharma and Bearson, 2013). In this study, *in vitro* experiments showed that *E. coli* MC2 is a strong biofilm producer when incubated in filtered fecal samples but only a weak biofilm producer in minimal media. Furthermore, the highest production of biofilm was observed at a temperature corresponding to extra-intestinal

environments. Importantly, *E. coli* MC2 had a greater ability to form biofilms in bovine feces than bovine commensal *E. coli* suggesting that EHEC O157:H7 are potentially more efficient than bovine commensal *E. coli* to survive in cow manure.

Interestingly, Vanaja et al. compared the expression pattern of *E. coli* O157:H7 strains with genotypes that predominate among bovine isolates (bovine-biased genotypes) and human clinical cases (clinical genotypes) and showed that genes involved in the resistance to adverse environments are up-regulated in the bovine-biased genotype (Vanaja et al., 2010). In this study, we showed for the first time that an O157:H7 *E. coli* strain responded to temperature stresses by inducing the genes *cspA* and *htrA* during its survival in bovine feces at low temperature. HtrA is a bifunctional protein with protease and chaperone properties at high and low temperatures, respectively. These two properties are required to refold or degrade misfolded proteins that accumulate in the periplasm under stressful conditions (Spiess et al., 1999; Skorko-Glonek et al., 2008). The RNA chaperone CspA is required for preventing the formation of secondary structures in mRNA molecules at low temperature (Ivancic et al., 2013). Interestingly, *cspA* is expressed transiently in the early stage of cold shock acclimation of the bacteria incubated in laboratory medium (Ivancic et al., 2013) whereas the gene was induced in *E. coli* MC2 after 7 days of incubation at low temperature. Furthermore, the transcription of the genes *cspA* and *htrA* was not induced in the bovine commensal *E. coli* BG1 and the reference EHEC strain EDL933 suggesting that the persistent bovine *E. coli* MC2 exhibits specific responses to cold stress in bovine feces at low temperature.

*E. coli* MC2 also activated GhoT/GhoS, EcnB/EcnA, and HicA/HicB toxin/antitoxin (TA) systems in bovine feces at low temperature. These TA systems are composed of a toxin, which causes bacterial growth arrest and dormancy during environmental stresses, and a cognate antitoxin, which neutralizes the toxin activity during normal growth conditions (for a review see Page and Peti, 2016). Such TA systems are known to act as a bacteriolytic module involved in programmed bacterial cell death (EcnB/EcnA) and to increase bacterial persistence in response to amino acid or glucose starvation, (HicA/HicB) or chemical stresses (GhoT/GhoS) (Bishop et al., 1998; Jørgensen et al., 2009; Cheng et al., 2014). In addition, GhoT not only leads to the formation of dormant cells under stress conditions but also impacts early biofilm formation by *E. coli* (Wang et al., 2013). TA systems activation is very complex and can occur at both transcriptional and post-transcriptional levels (Otsuka, 2016; Page and Peti, 2016; Turnbull and Gerdes, 2017). For example, nutrient starvation induced *hicAB* transcription but toxin HicA also stimulates the synthesis of antitoxin HicB when HicA is in excess (Turnbull and Gerdes, 2017). Nevertheless, our q-PCR data strongly suggest a potential role for TA systems in the survival of O157:H7 *E. coli* outside the animal GIT. Interestingly, our results also showed that significant differences in stress fitness genes expression was

observed not only between O157:H7 *E. coli* and commensal *E. coli* bovine strains (MC2 and BG1 respectively) but also between O157:H7 *E. coli* strains (MC2 and EDL933). This suggested that *E. coli* strains with different origins respond differently to stresses highlighting the potential role of cold shock proteins and TA systems in the persistence of bovine O157:H7 *E. coli* outside the bovine gut. Taken together, our results strongly suggested that *E. coli* MC2 must combat low temperature, nutrients starvation and chemical stresses to survive in bovine feces at low temperature. Activation of TA systems by the bacteria constitutes new areas of work to attempt to explain the persistence of O157:H7 *E. coli* in hostile extra intestinal environments. Further studies will be required to attribute an unequivocal role of GhoT/GhoS, EcnB/EcnA and HicA/HicB TA systems in the persistence of STEC O157:H7 in bovine excrement.

In conclusion, *E. coli* MC2 possessed many characteristics common among clinical O157:H7 *E. coli* strains and harbored a large arsenal of virulence determinants involved in different aspects of *E. coli* O157:H7 pathogenesis. The large number of colonization factors known to bind to intestinal epithelium and to biotic and abiotic surfaces, the capacity of *E. coli* MC2 to produce biofilms and to activate stress fitness genes in bovine feces could explain the persistence of the bacteria in the farm environment.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

YB, AS, DB, HB, and EF conceived and designed the experiments. AS, MB, MK, AD, and DB performed the experiments. PA and YB performed the bioinformatics analysis. YB, AS, PA, GJ, and EF analyzed the data and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This work was supported by CASDAR 73 (Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural; France Agrimer EDP 74 0914000451) and Interbev (Interprofession bétail et viande). AS was the recipient of an INRA-Région Auvergne fellowship (contract 23000731).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laura Quentin and Julien Daniel for excellent technical assistance. We are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrénées (Genotoul Bioinfo) for providing computing and storage resources.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00375/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Ahmad, A., and Zurek, L. (2006). Evaluation of the anti-terminator Q933 gene as a marker for *Escherichia coli* O157:H7 with high Shiga toxin production. *Curr. Microbiol.* 53, 324–328. doi: 10.1007/s00284-006-0089-3
- Amigo, N., Mercado, E., Bentancor, A., Singh, P., Vilte, D., Gerhardt, E., et al. (2015). Clade 8 and Clade 6 strains of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle in Argentina have hypervirulent-like phenotypes. *PLoS ONE* 10:e0127710. doi: 10.1371/journal.pone.0127710
- Aschtgen, M. S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Llobès, R., and Cascales, E. (2008). SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 7523–7531. doi: 10.1128/JB.00945-08
- Auffret, P., Segura, A., Bertin, Y., Klopp, C., Bouchez, O., Kérouédan, M., et al. (2017). Draft genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France. *Genome Announc.* 5:e01097-17. doi: 10.1128/genomeA.01097-17
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Taché, J., and Derzelle, S. (2009). Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 554–559. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02561.x
- Baines, D., Lee, B., and McAllister, T. (2008). Heterogeneity in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding in cattle is related to *Escherichia coli* O157:H7 colonization of the small and large intestine. *Can. J. Microbiol.* 54, 984–995. doi: 10.1139/W08-090
- Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., de la Foye, A., Harel, J., et al. (2013). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ. Microbiol.* 15, 610–622. doi: 10.1111/1462-2920.12019
- Bertin, Y., Girardeau, J. P., Chaucheyras-Durand, F., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Harel, J., et al. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ. Microbiol.* 13, 365–377. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02334.x
- Besser, T. E., Shaikh, N., Holt, N. J., Tarr, P. I., Konkel, M. E., Malik-Kale, P., et al. (2007). Greater diversity of Shiga toxin-encoding bacteriophage insertion sites among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle than in those from humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 671–679. doi: 10.1128/AEM.01035-06
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kérouédan, M., Ferré, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., et al. (2015). Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1397–1405. doi: 10.1128/AEM.03315-14
- Bishop, R. E., Leskiw, B. K., Hodges, R. S., Kay, C. M., and Weiner, J. H. (1998). The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J. Mol. Biol.* 280, 583–596. doi: 10.1006/jmbi.1998.1894
- Braun, V. (2003). Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front. Biosci.* 8, s1409–s1421. doi: 10.2741/1232
- Chassard, C., Scott, K. P., Marquet, P., Martin, J. C., Del'homme, C., Dapoigny, M., et al. (2008). Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 496–504. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00595.x
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C., and Martin, C. (2010). Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 640–647. doi: 10.1128/AEM.02054-09
- Chaucheyras-Durand, F., Madic, J., Doudin, F., and Martin, C. (2006). Biotic and abiotic factors influencing *in vitro* growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4136–4142. doi: 10.1128/AEM.02600-05
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., et al. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 1, 33, D325–D328. doi: 10.1093/nar/gki008
- Cheng, H. Y., Soo, V. W., Islam, S., McNulty, M. J., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2014). Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ. Microbiol.* 16, 1741–1754. doi: 10.1111/1462-2920.12373
- Clarke, K. R., and Owens, N. J. P. (1983). A simple and versatile microcomputer program for the determination of most probable number. *J. Microbiol. Methods* 1, 133–137. doi: 10.1016/0167-7012(83)90031-3
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., and Gordon, D. M. (2013). The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
- Conedera, G., Chapman, P. A., Marangon, S., Tisato, E., Dalvit, P., and Zuin, A. (2001). A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 85–93. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00489-X
- Dziva, F., Mahajan, A., Cameron, P., Currie, C., McKendrick, I. J., Wallis, T. S., et al. (2007). EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 258–264. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00724.x
- Dziva, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Smith, A. J., and Wallis, T. S. (2004). Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 150, 3631–3645. doi: 10.1099/mic.0.27448-0
- Easton, D. M., Allsopp, L. P., Phan, M. D., Moriel, D. G., Goh, G. K., Beatson, S. A., et al. (2014). The intimin-like protein FdeC is regulated by H-NS and temperature in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7337–7347. doi: 10.1128/AEM.02114-14
- Eppinger, M., Mammel, M. K., Leclerc, J. E., Ravel, J., and Cebula, T. A. (2011). Genome signatures of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from the bovine host reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2916–2925. doi: 10.1128/AEM.02554-10
- Franz, E., van Hoek, A. H., Bouw, E., and Aarts, H. J. (2011). Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8088–8096. doi: 10.1128/AEM.00745-11
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., and Rozand, C. V. (2006). Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* 117, 180–191. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.030
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Hagan, E. C., and Mobley, H. L. (2009). Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Mol. Microbiol.* 71, 79–91. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06509.x
- Halliwell, G., and Bryant, M. P. (1963). The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. *J. Gen. Microbiol.* 32, 441–448. doi: 10.1099/00221287-32-3-441
- Hews, C. L., Tran, S. L., Wegmann, U., Brett, B., Walsham, A. D. S., Kavanaugh, D., et al. (2017). The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium *ex vivo*. *Cell Microbiol.* 19:e12717. doi: 10.1111/cmi.12717
- Ivancic, T., Jamnik, P., and Stopar, D. (2013). Cold shock CspA and CspB protein production during periodic temperature cycling in *Escherichia coli*. *BMC Res. Notes* 6:248. doi: 10.1186/1756-0500-6-248
- Jeong, K. C., Hiki, O., Kang, M. Y., Park, D., and Kaspar, C. W. (2013). Prevalent and persistent *Escherichia coli* O157:H7 strains on farms are selected by bovine passage. *Vet. Microbiol.* 162, 912–920. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.034
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., and Scheutz, F. (2015). Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2410–2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15
- Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M., and Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 191, 1191–1199. doi: 10.1128/JB.01013-08
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* 9:e104984. doi: 10.1371/journal.pone.0104984
- Kapitein, N., and Mogk, A. (2013). Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 52–58. doi: 10.1016/j.mib.2012.11.009
- Karmali, M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15–38. doi: 10.1128/CMR.2.1.15



- Leedle, J. A., 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, 709–719.
- Liebana, E., Smith, R. P., Batchelor, M., McLaren, I., Cassar, C., Clifton-Hadley, F. A., et al. (2005). Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* 43, 898–902. doi: 10.1128/JCM.43.2.898-902.2005
- Mahajan, A., Currie, C. G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., et al. (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol.* 11, 121–137. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01244.x
- McWilliams, B. D., and Torres, A. G. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–19. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013
- Mellor, G. E., Sim, E. M., Barlow, R. S., D'Astak, B. A., Galli, L., Chinen, I., et al. (2012). Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 isolates are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4724–4731. doi: 10.1128/AEM.00365-12
- Mukherjee, A., Mammel, M. K., LeClerc, J. E., and Cebula, T. A. (2008). Altered utilization of N-acetyl-D-galactosamine by *Escherichia coli* O157:H7 from the 2006 spinach outbreak. *J. Bacteriol.* 190, 1710–1717. doi: 10.1128/JB.01737-07
- Munns, K. D., Zaheer, R., Xu, Y., Stanford, K., Laing, C. R., Gannon, V. P., et al. (2016). Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle. *PLoS ONE* 11:e0151673. doi: 10.1371/journal.pone.0151673
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Ogura, Y., Mondal, S. I., Islam, M. R., Mako, T., Arisawa, K., Katsura, K., et al. (2015). The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci. Rep.* 5:16663. doi: 10.1038/srep16663
- Otsuka, Y. (2016). Prokaryotic toxin-antitoxin systems: novel regulations of the toxins. *Curr. Genet.* 62, 379–382. doi: 10.1007/s00294-015-0557-z
- Page, R., and Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 12, 208–214. doi: 10.1038/nchembio.2044
- Pearson, J. S., and Hartland, E. L. (2014). The inflammatory response during enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Microbiol. Spectr.* 2:EHEC-0012-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0012-2013
- Persad, A. K., and LeJeune, J. T. (2014). Animal reservoirs of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2:EHEC-0027-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
- Puttamreddy, S., Cornick, N. A., and Minion, F. C. (2010). Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect Immun.* 78, 2377–2384. doi: 10.1128/IAI.00156-10
- Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B., et al. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10637–10642. doi: 10.1073/pnas.0704104104
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., et al. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia-Coli* serotype. *New Engl. J. Med.* 308, 681–685. doi: 10.1056/NEJM198303243081203
- Riordan, J. T., Viswanath, S. B., Manning, S. D., and Whittam, T. S. (2008). Genetic differentiation of *Escherichia coli* O157:H7 clades associated with human disease by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2070–2073. doi: 10.1128/JCM.00203-08
- Segura, A., Auffret, P., Klopp, C., Bertin, Y., and Forano, E. (2017). Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* strain BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract. *Stand. Genomic Sci.* 12:61. doi: 10.1186/s40793-017-0272-0
- Shaikh, N., and Tarr, P. I. (2003). *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 185, 3596–3605. doi: 10.1128/JB.185.12.3596-3605.2003
- Sharma, V. K., and Bearson, B. L. (2013). Hha controls *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by differential regulation of global transcriptional regulators FlhDC and CsgD. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2384–2396. doi: 10.1128/AEM.02998-12
- Shere, J. A., Bartlett, K. J., and Kaspar, C. W. (1998). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1390–1399.
- Shringi, S., Schmidt, C., Katherine, K., Brayton, K. A., Hancock, D. D., and Besser, T. E. (2012). Carriage of stx2a differentiates clinical and bovine-biased strains of *Escherichia coli* O157. *PLoS ONE* 7:e51572. doi: 10.1371/journal.pone.0051572
- Simon-Assmann, P., Spenle, C., Lefebvre, O., and Keding, M. (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 96, 175–206. doi: 10.1016/B978-0-12-381280-3.00008-7
- Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J., and Lipinska, B. (2008). The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology* 154, 3649–2658. doi: 10.1099/mic.0.2008/020487-0
- Söderlund, R., Jernberg, C., Ivarsson, S., Hedenström, I., Eriksson, E., Bongcam-Rudloff, E., et al. (2014). Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Swedish cattle and human cases: population dynamics and virulence. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3906–3912. doi: 10.1128/JCM.01877-14
- Soon, J. M., Chadd, S. A., and Baines, R. N. (2011). *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle: on farm contamination and pre-slaughter control methods. *Anim. Health Res. Rev.* 12, 197–211. doi: 10.1017/S1466252311000132
- Spieß, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339–347. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80743-6
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C. Jr., Jelacic, S., Habbes, R. L., Ward, T. R., et al. (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* 68, 1400–1407. doi: 10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207–217. doi: 10.1038/nrmicro2298
- Teng, C. H., Tseng, Y. T., Maruvada, R., Pearce, D., Xie, Y., Paul-Satyaseela, M., et al. (2010). NlpI contributes to *Escherichia coli* K1 strain RS218 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* 78, 3090–3096. doi: 10.1128/IAI.00034-10
- Torres, A. G., and Payne, S. M. (1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 23, 825–833. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2641628.x
- Torres, A. G., Perna, N. T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F. R., and Kaper, J. B. (2002). Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45, 951–966. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03094.x
- Totsika, M., Wells, T. J., Beloin, C., Valle, J., Allsopp, L. P., King, N. P., et al. (2012). Molecular characterization of the EhaG and UpaG trimeric autotransporter proteins from pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2179–2189. doi: 10.1128/AEM.06680-11
- Turnbull, K. J., and Gerdes, K. (2017). HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses hicAB transcription to selectively produce HicB antitoxin. *Mol. Microbiol.* 104, 781–792. doi: 10.1111/mmi.13662
- Vanaja, S. K., Springman, A. C., Besser, T. E., Whittam, T. S., and Manning, S. D. (2010). Differential expression of virulence and stress fitness genes between *Escherichia coli* O157:H7 strains with clinical or bovine-biased genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 60–68. doi: 10.1128/AEM.01666-09
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Jubelin, G., Jacques, M., and Harel, J. (2015). Biofilm-forming abilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1448–1458. doi: 10.1128/AEM.02983-15
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., et al. (2017). Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog.* 13:e1006246. doi: 10.1371/journal.ppat.1006246
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., et al. (2013). Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ. Microbiol.* 15, 1734–1744. doi: 10.1111/1462-2920.12063
- Wells, T. J., McNeilly, T. N., Totsika, M., Mahajan, A., Gally, D. L., and Schembri, M. A. (2009). The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA

- response in O157:H7 challenged cattle. *Environ. Microbiol.* 11, 1803–1814. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01905.x
- Widgren, S., Söderlund, R., Eriksson, E., Fasth, C., Aspan, A., Emanuelson, U., et al. (2015). Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 status in 126 cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 121, 343–352. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.08.010
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., et al. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Invest.* 117, 3519–3529. doi: 10.1172/JCI30727
- Yang, Z., Kovar, J., Kim, J., Nietfeldt, J., Smith, D. R., Moxley, R. A., et al. (2004). Identification of common subpopulations of non-sorbitol-fermenting, beta-glucuronidase-negative *Escherichia coli* O157:H7 from bovine production environments and human clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6846–6854. doi: 10.1128/AEM.70.11.6846-6854.2004
- Yaron, S., and Römling, U. (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* 7, 496–516. doi: 10.1111/1751-7915.12186
- Zhang, X. S., and Woolhouse, M. E. (2011). *Escherichia coli* O157 infection on Scottish cattle farms: dynamics and control. *J. R. Soc. Interface* 8, 1051–1058. doi: 10.1098/rsif.2010.0470
- Zhang, Y., Laing, C., Steele, M., Ziebell, K., Johnson, R., Benson, A. K., et al. (2007). Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics* 8:121. doi: 10.1186/1471-2164-8-121
- Zhou, M., Yang, Y., Chen, P., Hu, H., Hardwidge, P. R., and Zhu, G. (2015). More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8883–8890. doi: 10.1007/s00253-015-6946-x
- Ziebell, K., Konczy, P., Yong, I., Frost, S., Mascarenhas, M., Kropinski, A. M., et al. (2008). Applicability of phylogenetic methods for characterizing the public health significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1671–1675. doi: 10.1128/AEM.01619-07

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Segura, Auffret, Bibbal, Bertoni, Durand, Jubelin, Kérourédan, Brugère, Bertin and Forano. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Supplementary Material

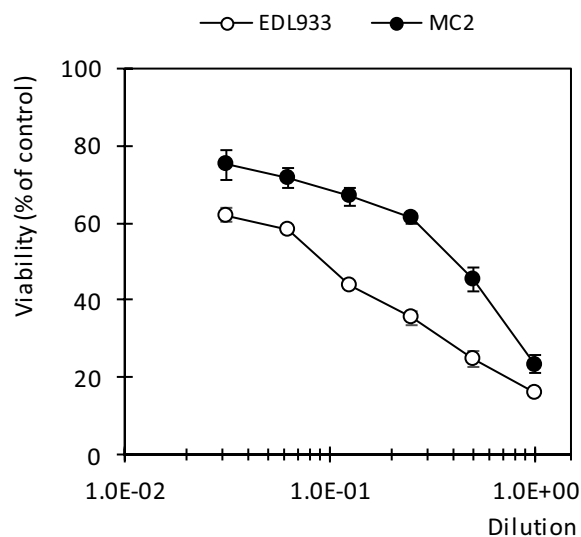
### FACTORS INVOLVED IN THE PERSISTENCE OF A SHIGA TOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 STRAIN IN BOVINE FECES AND GASTRO-INTESTINAL CONTENT

Audrey Segura, Pauline Auffret, Delphine Bibbal, Marine Bertoni, Alexandra Durand, Grégory Jubelin, Monique Kérourédan, Hubert Brugère, Yolande Bertin, Evelyne Forano\*

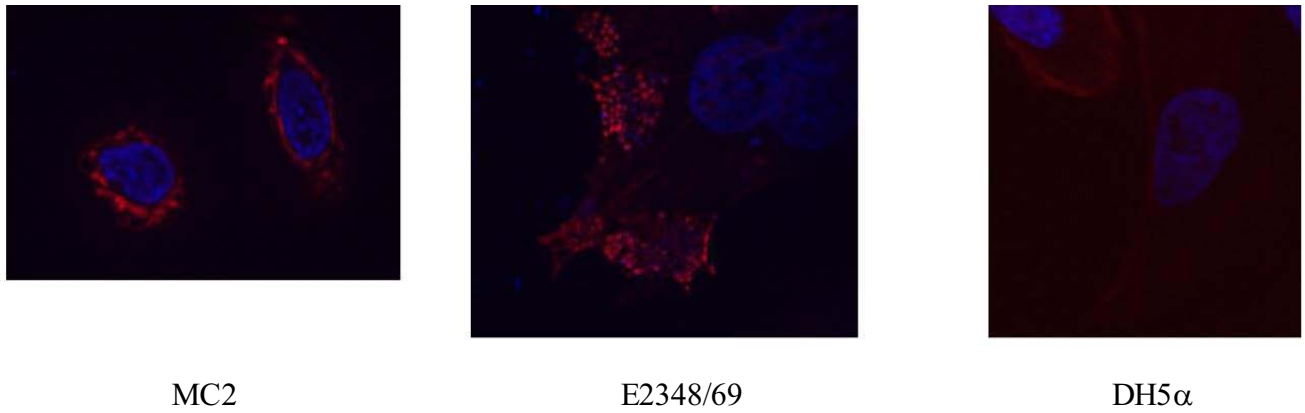
\* Correspondence: Evelyne Forano: evelyne.forano@inra.fr

#### 1. Supplementary Figures and Tables

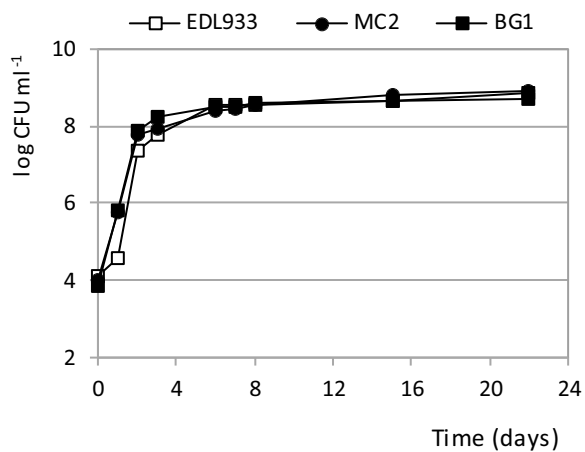
**Supplementary Figure 1.** Cytotoxic activity of MC2 on Vero cells. The survival rate of Vero cells treated with *E. coli* DH5 $\alpha$  cell culture supernatant was defined as 100%. EDL933 was used as a positive control.



**Supplementary Figure 2.** Formation of A/E lesions after infection of HeLa cells by *E. coli* MC2, by using the FAS test. The EPEC strain E2348/69 and *E. coli* DH5 $\alpha$  were used as a positive and negative controls, respectively.



**Supplementary Figure 3.** Growth curves of *E. coli* strains MC2, BG1 and EDL933 in filtered bovine fecal juice. The cultures were incubated at 15°C without shaking. Each time point is the mean of three independent experiments.



**Supplementary Table 1.** Bacterial strains used in phylogenetic analysis.

Strain	Number	Origin	Source	Clade	Lineage	Reference
08BKT061141	NZ_JJOL000000000.1	bovine feces	cattle	7	II	Soderlung <i>et al.</i> , 2014
09BKT002497	JJOJ000000000.1	bovine feces	cattle	5 6	I/II	Soderlung <i>et al.</i> , 2014
09BKT048303	NZ_JJOM000000000.1	bovine feces	cattle	7	II	Soderlung <i>et al.</i> , 2014
287Jul8F	NZ_LHAJ000000000.1	bovine feces	cattle (low shedder)	2	I*	Munns <i>et al.</i> , 2016
299Jul8F	NZ_LHAK000000000.1	bovine feces	cattle (low shedder)	2	I*	Munns <i>et al.</i> , 2016
342Jul26F	NZ_LHAL000000000.1	bovine feces	cattle (low shedder)	5	II*	Munns <i>et al.</i> , 2016
7.1_Anguill	LAZD000000000.1	farm	cattle	6	I/II*	Amigo <i>et al.</i> , 2015
EC4042	ABHM000000000.2	spinach outbreak	human patient	8**	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
EC4076	ABHQ000000000.1	spinach outbreak	human patient	8**	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
EC4113	ABHP000000000.1	spinach outbreak	human patient	8**	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
EC4115	CP001164.1	spinach outbreak	human patient	8	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
EC4206	ABHK000000000.2	spinach outbreak	human patient	8**	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
EC869	ABHU000000000.1	ground beef	cattle	7	II	Eppinger <i>et al.</i> , 2011
EDL933	AE005174.2	hamburger outbreak	human patient	3	I	Latif <i>et al.</i> , 2014
FRIK2000	ACXO000000000.1	bovine reservoir	cattle	7	II	Dowd <i>et al.</i> , 2010
FRIK966	ACXN000000000.1	bovine reservoir	cattle	7	II	Dowd <i>et al.</i> , 2010
JEONG-1266	NZ_CP014314.1	bovine feces	cattle (super shedder)	8**	I/II*	Teng <i>et al.</i> , 2016
K3_66F	NZ_LHAN000000000.1	bovine feces	cattle (super shedder)	2	I*	Munns <i>et al.</i> , 2016
K9_45F	LHAP000000000.1	bovine feces	cattle (super shedder)	2	I*	Munns <i>et al.</i> , 2016
MC2	NJDB000000000.1	bovine feces	cattle	7**	II*	This study
Rafaela_II	LAYW000000000.1	farm	cattle	8	I/II*	Amigo <i>et al.</i> , 2015
Sakai	NC_002695.1	radish sprouts outbreak	human patient	1	I	Hayashi <i>et al.</i> , 2001
SS17	NZ_CP008805.1	bovine feces	cattle (super shedder)	8	I/II	Cote <i>et al.</i> , 2015
SS52	NZ_CP010304.1	bovine feces	cattle (super shedder)	8**	I/II	Katani <i>et al.</i> , 2015
TW14359	NC_013008.1	spinach outbreak	human patient	8	I/II	Strachan <i>et al.</i> , 2015
T1543_06	JJOK000000000.1	bovine feces	cattle	8	I/II	Soderlung <i>et al.</i> , 2014

\* Lineage determined in this study using the LSPA-6 method (see the Materials and Methods section).

\*\* Clade determined in this study using the Manning SNP typing method (see the Materials and Methods section).

- Amigo, N., Mercado, E., Bentancor, A., Singh, P., Vilte, D., Gerhardt, E., *et al.* (2015). Clade 8 and Clade 6 strains of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle in Argentina have hypervirulent-like phenotypes. *PLoS One*. 10(6): e0127710.
- Cote, R., Katani, R., Moreau, M.R., Kudva, I.T., Arthur, T.M., DebRoy, C., *et al.* (2015). Comparative analysis of super-shedder strains of *Escherichia coli* O157:H7 reveals distinctive genomic features and a strongly aggregative adherent phenotype on bovine rectoanal junction squamous epithelial cells. *PLoS One*. 10(2):e0116743.
- Dowd, S.E., Crippen, T.L., Sun, Y., Gontcharova, V., Youn, E., Muthaiyan, A., *et al.* (2010). Microarray analysis and draft genomes of two *Escherichia coli* O157:H7 lineage II cattle isolates FRIK966 and FRIK2000 investigating lack of Shiga toxin expression. *Foodborne Pathog Dis*. 7,763-73.
- Eppinger, M., Mammel, M.K., Leclerc, J.E., Ravel, J., and Cebula, T.A. (2011). Genome signatures of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from the bovine host reservoir. *Appl Environ Microbiol*. 77, 2916-2925.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., *et al.* (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res*. 8, 11-22.
- Katani, R., Cote, R., Kudva, I.T., DebRoy, C., Arthur, T.M., and Kapur, V. (2017). Comparative genomics of two super-shedder isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*. 12(8):e0182940.
- Munns, K.D., Zaheer, R., Xu, Y., Stanford, K., Laing, C.R., Gannon, V.P., *et al.* (2016). Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from Super-Shedder and Low-Shedder cattle. *PLoS One*. 11(3):e0151673.
- Söderlund, R., Jernberg, C., Ivarsson, S., Hedenström, I., Eriksson, E., Bongcam-Rudloff, E. *et al.* (2014). Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Swedish cattle and human cases: population dynamics and virulence. *J Clin Microbiol*. 52, 3906-3912.
- Strachan, N.J., Rotariu, O., Lopes, B., MacRae, M., Fairley, S., Laing, C., *et al.* (2015). Whole genome sequencing demonstrates that geographic variation of *Escherichia coli* O157 genotypes dominates host association. *Sci Rep*. 5:14145.
- Teng, L., Ginn, A., Jeon, S., Kang, M., and Jeong, K.C. (2016). Complete genome sequence of an *Escherichia coli* O157:H7 strain isolated from a Super-Shedder steer. *Genome Announc*. 4(2). pii: e00258-16.

**Supplementary Table 2.** Oligonucleotide primers used in this study (relative RT-qPCR)

Gene	Primer sequence	
	Forward	Reverse
<i>acrA</i>	GCAGCTTAGCCCTAACAGGA	CCGCTAACTTGAGGACGAAC
<i>ahpC</i>	GACGTTGCTGACCACTACGA	CGCATGTTGTCGAAGTTACG
<i>bolA</i>	CAACCCGTATTCCTCGAAGT	CAGCGCATGAACGGTAGTAG
<i>chaB</i>	CACGTTCTACCGTCTCATGC	CCCTTTGGCATATTCATGCT
<i>cspA</i>	CCGGTAAAATGACTGGTATCG	TCGATGGTGAAGGACACTTTC
<i>cspD</i>	CCAAAGGGTTTGGTTTCATC	ACTTCGACGGGCACAATAAC
<i>clpA</i>	CACCACGACGTGCGTTATAC	CGCCACATTAACGGTTTTCT
<i>dps</i>	GTAGCTCTGGGGACCACTCA	AGGATATCTGCGGTGTCGTC
<i>ecnA</i>	ATGATGAAACGCCTTATC	GGCAGCGCGGGAGATGG
<i>ecnB</i>	GGTGAAGAAGACAATTGCAG	TTATTGCTGCGCTTTCGTTG
<i>elaB</i>	CACGTATCGATGACGACCTG	CTGCTTCGCCGATAGTAAT
<i>gabD</i>	CGGTGGGTAATGAACTGACC	GCTTTATCGAGATCGGCATC
<i>gadA</i>	CTGGGGCCGTATGAGTTCA	GGGTGTATCCCGGATCTTC
<i>gadE</i>	GAGAAATTAGATGCCGAGAG	TTGTGAATTCTTATGGGGCA
<i>ghoS</i>	GGAAGGTAAAACAAGTTC	CGATGTCGTTATTGCGAAG
<i>ghoT</i>	GGCACTATTCTCTAAAAT	AAGTAATGCCACAGGCAGAC
<i>grpE</i>	CATGGATCAGCACGAAGAGA	AGGTTTTCCATTTCCGGCTTT
<i>hchA</i>	GCCGCAGAAAGATGAAAAAG	AGCTACGCTCGGCTTTCAG
<i>hdeB</i>	CACTGGTGAACGCACAATCT	GGAAATTTGAGTGAGATCGGTTT
<i>hicA</i>	AAAGCGAGTTCAGACGTTGG	CCGAGTTGTTTCAGGATTGC
<i>hicB</i>	GGATATCCCTGAAGCGTTGA	GCGACGCTCAAAGTACTTC
<i>htrA</i>	CAGGTTGATTCCAGCTCCAT	TCAGCGATGTTTTTCACAGC
<i>hyaA</i>	TATGGTCAGCGTATCCACGA	AAGAAACGCCATCATTCCAG
<i>katE</i>	GGCTAAGTCAGACGCCATTC	TTCAGCTGGTCGTCAGTCAG
<i>mazE</i>	TAAAGCGTTGGGAAAATTCA	TCGTTGACCAGTTCAGCAAG
<i>mazF</i>	TTGACCCGACAAAAGGTAGC	AGCTAACGCTACGCCATCAC
<i>mdtE/yhiU</i>	CACCTTTACAGGCCGAGCTA	GGTGACATTGGCTTCTGCTT
<i>osmC</i>	AGAAAGGTCAGGCACACTGG	AAAGCGCCATTGAGAAACAT
<i>osmY</i>	GAAGGCTCTGTGAAGGGCTA	GCTTTGGCGATACTTTCAGC
<i>otsB</i>	CAGAACCCTTAACCGAAACC	GCCCTGATATCAATGCCAAT
<i>poxB</i>	CTGCCGGTAAAATTATCGT	GGCTTCATCGATTTTCAGAGG
<i>psiF</i>	TTGCTTTTCGGTCTGGTTTT	TGCTGTTCTTCAGGCAATCA
<i>relE</i>	CCCCTCAACAAGGAAAGAG	TTGCTAAAGGCCAGAAATGC
<i>rpoS</i>	AAGAGAACGGTCCGGAAGAT	GAGGCCAATTTACGACCTA
<i>slp</i>	GCGAAGCCTGATATTGAAGC	GGATGCCCTGCATATTCATC
<i>speA</i>	GAACGTATGGCGGACAAAAT	CGATAGCACCGTCAGAGTCA
<i>sspA</i>	ATGAGTTCAGCCTGGTCGAT	GCATTTACGTTCTGCTTCA
<i>sugE</i>	TTCAACCATCAGCTTTGCAG	GGTAATAAACAACCTCGGCGTCAA
<i>tufA</i>	TGGTTGATGACGAAGAGCTG	GCTCTGGTCCGGAATGTAG
<i>uspA</i>	CTATGGCTCGCCATACAAT	GTGATTGGGTAGCCTGCATT
<i>yciE</i>	GCAGCACATTAGCGAAACAA	AGCCACTGATCGAACCTTTG
<i>yehX</i>	GCTGGTCACGCATGATATTG	CGCCACACTACGTAACGAAA
<i>yehY</i>	AAGAATACGCCAACCGTCAG	GAAGGCACGGTCTGAATGAC
<i>ygiW/gadW</i>	GCATCAGCACTGTTTCAGGA	GACATCCTGGAGGCGAGTAA
<i>yggE</i>	GCGCTACCATGTTTCCAAC	CAGGTGTTTTAGCGGGTTGT
<i>yhiO</i>	TGCGATCCATTGCTCTATCA	CAATGCGCTGGTCAGAATAA
<i>yhiU</i>	AATGTCACCTCGCCGATTAC	CACTGGCGACCTCTTCTTTC
<i>yhiV/cmeB</i>	CCAATGGTATGTACGCAACG	CGACCAGGTCTGCCATAAAT





Supplementary Table 3. VF's encoding genes in the MC2 genome. The MC2 genome was screened for virulence factors using blastn and the Virulence Factors database (VFDB) DNA dataset.

Query (MC2 CDS)	Query Length (bp)	Subject (VFDB genes)	Subject Name	Type	Subject Description	%id	Alignment Length (bp)	Coverage (%)	Mismatches	Gap Openings	Query Start	Query End	Subject Start	Subject End	E-Value	BitScore
kJNJD01000025.1_cds_OXL47314.1_1	252	VFG040997	aaIQ	T6SS	(aaIQ) - [AAV/SCH] (SS182) [Escherichia coli O44:H18 042]	91.3	252	100	21	0	1	252	1	251	5,00E-99	342
kJNJD01000025.1_cds_OXL45575.1_1	324	VFG040998	aaIR	T6SS	(aaIR) - [AAV/SCH] (SS182) [Escherichia coli O44:H18 042]	97.8	324	100	7	0	1	324	141	464	5,00E-164	560
kJNJD01000007.1_cds_OXL49444.1_1	2109	VFG035841(gi:254793002)	aec15	T6SS	(aec15) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O157:H7 str. TW14359]	100	2109	100	0	0	1	2109	37	2145	0	3895
kJNJD01000038.1_cds_OXL46609.1_5	501	VFG035783(gi:15799913)	aec17	T6SS	(aec17) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	501	100	0	0	1	501	1	501	0	926
kJNJD01000038.1_cds_OXL46611.1_7	1392	VFG035760(gi:15799911)	aec18	T6SS	(aec18) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1392	100	0	0	1	1392	1	1392	0	2571
kJNJD01000038.1_cds_OXL46612.1_8	414	VFG035735(gi:15799910)	aec19	T6SS	(aec19) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	414	100	0	0	1	414	1	414	0	765
kJNJD01000038.1_cds_OXL46614.1_10	1083	VFG035686(gi:15799908)	aec22	T6SS	(aec22) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1083	100	0	0	1	1083	1	1083	0	2001
kJNJD01000038.1_cds_OXL46615.1_11	1281	VFG035662(gi:15929481)	aec23	T6SS	(aec23) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	1281	100	0	0	1	1281	1	1281	0	2366
kJNJD01000038.1_cds_OXL46616.1_12	525	VFG035635(gi:15799906)	aec24	T6SS	(aec24) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	525	100	0	0	1	525	1	525	0	970
kJNJD01000038.1_cds_OXL46617.1_13	1332	VFG035610(gi:15799905)	aec25	T6SS	(aec25) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1332	100	0	0	1	1332	1	1332	0	2460
kJNJD01000038.1_cds_OXL46618.1_14	762	VFG035584(gi:15799904)	aec26	T6SS	(aec26) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	762	100	0	0	1	762	1	762	0	1408
kJNJD01000038.1_cds_OXL46619.1_15	2778	VFG035566(gi:254791353)	aec27 / clpV	T6SS	(aec27/clpV) Hsp100/Clp ATPase [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O157:H7 str. TW14359]	100	2778	100	1	0	1	2778	1	2778	0	5125
kJNJD01000038.1_cds_OXL46620.1_16	744	VFG035532(gi:15799902)	aec28	T6SS	(aec28) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	744	100	0	0	1	744	1	744	0	1375
kJNJD01000038.1_cds_OXL46621.1_17	1413	VFG035513(gi:291281040)	aec29	T6SS	(aec29) ImpA domain protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615]	100	1413	100	0	0	1	1413	1	1413	0	2610
kJNJD01000038.1_cds_OXL46622.1_18	3465	VFG035490(gi:387505144)	aec30	T6SS	(aec30) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O55:H7 str. RM12573]	100	3465	100	0	0	1	3465	61	3525	0	6399
kJNJD01000038.1_cds_OXL46623.1_19	1410	VFG035464(gi:291281038)	aec31	T6SS	(aec31) ImpA domain protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615]	100	1410	100	0	0	1	1410	91	1500	0	2604
kJNJD01000038.1_cds_OXL46624.1_20	480	VFG035434(gi:15799897)	aec32	T6SS	(aec32) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	480	100	0	0	1	480	1	480	0	887
kJNJD01000022.1_cds_OXL47585.1_36	1656	VFG001444(gi:9965749)	asIA		(asIA) putative arylsulfatase [AsIA (VF0238)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]	93.9	1429	86,29227	86	1	1	1429	1	1428	0	2156
kJNJD01000037.1_cds_OXL46678.1_49	2091	VFG001731(gi:26249445)	iha / IrgA	Adhesion/Iron	(c610) bifunctional enterobactin receptor/adhesin protein [IrgA homolog adhesion (iha) (A624)] [Escherichia coli CFT073]	99.7	2091	100	6	0	1	2091	1	2091	0	3829
kJNJD01000083.1_cds_OXL45897.1_2	2580	VFG036018(gi:260854504)	cath	Adhesion	(cath) Aida1 adhesin [Cath, AIDA1 type (CVF745)] [Escherichia coli O26:H11 str. 11368]	96	2582	100,0775	100	4	1	2580	169	2748	0	4189
kJNJD01000014.1_cds_OXL48423.1_39	324	VFG000830(gi:15804247)	cesAB	LEE	(cesAB) chaperone for EspA and EspB [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.7	324	100	1	0	1	324	1	324	2,00E-174	593
kJNJD01000014.1_cds_OXL48413.1_29	456	VFG000820(gi:15804237)	cesD	LEE	(cesD) chaperone for EspB and EspD [TTSS (VF0191)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	456	100	0	0	1	456	1	456	0	843
kJNJD01000014.1_cds_OXL48390.1_6	408	VFG000797(gi:15804214)	cesD2	LEE	(cesD2) chaperone for EspD [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	408	100	0	0	1	408	1	408	0	754
kJNJD01000014.1_cds_OXL48400.1_16	384	VFG000807(gi:15804224)	cesF	LEE	(cesF) CesF, chaperone for EspF [TTSS (VF0191)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	384	100	0	0	1	384	1	384	0	710
kJNJD01000014.1_cds_OXL48407.1_23	354	VFG000814(gi:15804231)	cesL	LEE	(cesL) chaperone for SepL [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	354	100	0	0	1	354	1	354	0	654

471	VF000804(gi:15804221)	cesT	- LEE	100	471	100	0	0	1	471	1	471	0	870	(cesT) chaperone for SepD [LEE encoded T3SS (SSO20)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] (cheA) chemotaxis protein CheA [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
1965	VF0403094(gi:15802300)	cheA	flagella	100	1965	100	1	0	1	1965	1	1965	0	3626	(cheB) chemotaxis-specific methyltransferase [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
1050	VF0403090(gi:15802295)	cheB	flagella	99.9	1050	100	1	0	1	1050	1	1050	0	1936	(cheR) chemotaxis methyltransferase CheR [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
861	VF0403091(gi:15802296)	cheR	flagella	100	861	100	0	0	1	861	1	861	0	1591	(cheW) purine-binding chemotaxis protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
504	VF0403093(gi:15802299)	cheW	flagella	99.6	504	100	2	0	1	504	1	504	0	924	(CheY) chemotaxis regulatory protein CheY [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
390	VF0403089(gi:15802294)	cheY	flagella	99.7	390	100	1	0	1	390	1	390	0	717	(CheZ) chemotaxis regulator CheZ [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
645	VF0403068(gi:15802293)	cheZ	flagella	100	645	100	0	0	1	645	1	645	0	1192	(chuA) outer membrane heme/hemoglobin receptor ChuA [Hemin uptake (CVF460)] [Escherichia coli O55:H7 str. C89615]
1983	VF0304265(gi:1291284872)	chuA	iron	100	1983	100	0	0	1	1983	1	1983	0	3663	(chuS) hypothetical protein [Hemin uptake (CVF460)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai] (chuT) putative periplasmic binding protein [Hemin uptake (CVF460)] [Escherichia coli O17:K52:H18 str. UMN026]
1029	VF012592(gi:15833633)	chuS	iron	100	1029	100	0	0	1	1029	1	1029	0	1901	(chuU) permease of iron compound ABC transporter [Hemin uptake (CVF460)] [Escherichia coli O55:H7 str. C89615]
993	VF0304293(gi:1218707131)	chuT	iron	99.1	993	100	9	0	1	993	1	993	0	1764	(chuW) coproporphyrinogen III oxidase [Chu (VF0234)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
957	VF0304355(gi:1291284878)	chuU	iron	100	957	100	0	0	1	957	37	993	0	1768	(chuX) hypothetical protein [Chu (VF0234)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
1338	VF012609(gi:15804047)	chuW	iron	100	1338	100	0	0	1	1338	1	1338	0	2471	(chuY) hypothetical protein [Chu (VF0234)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
495	VF012615(gi:15804048)	chuX	iron	100	495	100	0	0	1	495	1	495	0	915	(csgA) cyptic curli major subunit [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
624	VF012621(gi:15804049)	chuY	iron	100	624	100	0	0	1	624	1	624	0	1153	(csgB) curli minor subunit [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
459	VF0402730(gi:15801159)	csgA	Adhesion	100	459	100	0	0	1	459	1	459	0	848	(csgC) putative autoagglutination protein [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
456	VF0402729(gi:15801158)	csgB	Adhesion	100	456	100	0	0	1	456	1	456	0	843	(csgD) DNA-binding transcriptional regulator CsgD [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
333	VF0402731(gi:15801160)	csgC	Adhesion	100	333	100	0	0	1	333	1	333	0	616	(csgE) curli assembly protein CsgE [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
651	VF0402728(gi:15801157)	csgD	Adhesion	100	651	100	0	0	1	651	1	651	0	1203	(csgF) curli assembly protein CsgF [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
390	VF0402727(gi:15801156)	csgE	Adhesion	100	390	100	0	0	1	390	1	390	0	721	(csgG) curli production assembly/transport component, 2nd curli operon [curli fibers (A1093)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
417	VF0402726(gi:15801155)	csgF	Adhesion	99.8	417	100	1	0	1	417	1	417	0	767	(eae) intimin adherence protein [Intimin (VF0202)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]
834	VF0402725(gi:15801154)	csgG	Adhesion	100	834	100	0	0	1	834	1	834	0	1541	(eaeH) invasin [EaeH (CVF679)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]
2805	VF000803(gi:15804220)	eae	LEE Adhesion	100	2805	100	0	0	1	2805	1	2805	0	5180	(ECO42_4548) hypothetical protein [SCH-T6SS (CVF734)] [Escherichia coli O44:H18 O42]
4254	VF0304551(gi:1209400580)	eaeH	Adhesion	100	4254	100	0	0	1	4254	1	4254	0	7856	
945	VF0305339(gi:387609969)	ECO42_4548	T6SS	95.6	791	83,7037	35	0	28	818	1	791	0	1267	

lc INJDB01000036.1_cds_OXL46693.1_8	588	VFG034405(gi:209398971)	ecpA	Adhesion	100	588	100	0	0	1	588	1	588	0	1086
lc INJDB01000036.1_cds_OXL46697.1_12	711	VFG034516(gi:209398078)	ecpE	Adhesion	100	711	100	0	0	1	711	1	711	0	1314
lc INJDB01000036.1_cds_OXL46696.1_11	1581	VFG002415(gi:15799995)	ecpD / yagW	Adhesion	100	1579	99,8735	0	0	1	1579	1	1579	0	2916
lc INJDB01000036.1_cds_OXL46695.1_10	2526	VFG002415(gi:15799996)	ecpC / yagX	Adhesion	100	2526	100	0	0	1	2526	1	2526	0	4865
lc INJDB01000036.1_cds_OXL46694.1_9	669	VFG002412(gi:15799997)	ecpB / yagY	Adhesion	99,9	669	100	1	0	1	669	1	669	0	1230
lc INJDB01000036.1_cds_OXL46692.1_7	591	VFG002413(gi:15799999)	ecpR / yagK	Adhesion	100	591	100	0	0	1	591	1	591	0	1092
lc INJDB01000038.1_cds_OXL46613.1_9	1851	VFG035711(gi:15829483)	ECs0229	T6SS	100	1851	100	0	0	1	1851	1	1851	0	3419
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49241.1_148	633	VFG042095(gi:15832966)	ECs3712	ETT2	100	633	100	0	0	1	633	1	633	0	1170
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49256.1_165	234	VFG042079(gi:15832982)	ECs3728	ETT2	100	234	100	0	0	1	234	1	234	200E-126	433
lc INJDB01000014.1_cds_OXL48403.1_19	417	VFG012379(gi:15833820)	ECs4566	LEE	100	417	100	0	0	1	417	1	417	0	771
lc INJDB01000014.1_cds_OXL48421.1_37	696	VFG012413(gi:15833838)	ECs4584	LEE	100	696	100	0	0	1	696	1	696	0	1286
lc INJDB01000002.1_cds_OXL50529.1_111	885	VFG043545(gi:218560235)	nlpI	Adhesion	99,8	885	100	2	0	1	885	1	885	0	1624
lc INJDB01000003.1_cds_OXL50425.1_32	3984	VFG035975(gi:15829816)	ehaA	Adhesion/T5aSS	100	3984	100	0	0	1	3984	1	3984	0	7358
lc INJDB01000003.1_cds_OXL50288.1_94	2943	VFG035991(gi:15829678)	ehaB	Adhesion	100	2943	100	0	0	1	2943	1	2943	0	5435
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49259.1_168	2061	VFG042078(gi:15832985)	eivA	ETT2	100	2061	100	0	0	1	2061	1	2061	0	3807
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49258.1_167	1320	VFG042081(gi:15832984)	eivC	ETT2	100	1320	100	0	0	1	1320	1	1320	0	2438
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49260.1_169	1146	VFG042077(gi:15832986)	eivE	ETT2	100	1146	100	0	0	1	1146	1	1146	0	2117
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49262.1_171	750	VFG042079(gi:15832988)	eivF	ETT2	99,9	750	100	1	0	1	750	1	750	0	1380
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49261.1_170	1704	VFG042076(gi:15832987)	eivG	ETT2	100	1704	100	0	0	1	1704	1	1704	0	3147
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49257.1_166	468	VFG042080(gi:15832983)	eivI	ETT2	100	336	71,79487	0	0	133	468	1	336	0	621
lc INJDB01000009.1_cds_OXL49255.1_164	618	VFG042082(gi:15832981)	eivJ	ETT2	100	618	100	0	0	1	618	1	618	0	1142
lc INJDB01000013.1_cds_OXL48565.1_39	747	VFG012978(gi:74311131)	entA	iron	98,4	747	100	12	0	1	747	1	747	0	1314
lc INJDB01000013.1_cds_OXL48564.1_38	858	VFG012980(gi:24111940)	entB	iron	99,2	858	100	7	0	1	858	1	858	0	1546
lc INJDB01000013.1_cds_OXL48562.1_36	1176	VFG020172(gi:18732369)	entC	iron	98,8	1176	100	14	0	1	1176	1	1176	0	2095
lc INJDB01000013.1_cds_OXL48661.1_25	621	VFG013006(gi:10804572)	entD	iron	99,8	621	100	1	0	1	621	151	771	0	1142

ic NJDB01000013.1_cds_OXL48563.1_37	1611	VFG012989(gi:82543040)	eniE	iron	97	1611	100	49	0	1	1611	1	1611	0	2704
ic NJDB01000013.1_cds_OXL48555.1_29	3882	VFG012997(gi:82775864)	eniF	iron	97.8	3882	100	86	0	1	3882	1	3882	0	6693
ic NJDB01000013.1_cds_OXL48560.1_34	1251	VFG044165(gi:26246570)	eniS	iron	96.4	1251	100	45	0	1	1251	1	1251	0	2061
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49254.1_163	987	VFG042083(gi:15832980)	epaO	ETT2	100	987	100	0	0	1	987	1	987	0	1823
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49253.1_162	666	VFG042084(gi:15832979)	epaP	ETT2	100	666	100	0	0	1	666	1	666	0	1230
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49252.1_161	261	VFG042085(gi:15832978)	epaQ	ETT2	100	261	100	0	0	1	261	1	261	2,00E-141	483
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49251.1_159	1122	VFG042086(gi:15832975)	epaS	ETT2	100	1122	100	0	0	1	1122	1	1122	0	2073
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49268.1_155	750	VFG042087(gi:15832973)	epaH	ETT2	100	735	98	0	0	16	750	1	735	0	1358
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49247.1_154	240	VFG042090(gi:15832972)	epaI	ETT2	100	240	100	0	0	1	240	1	240	9,00E-130	444
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49246.1_153	333	VFG042089(gi:15832971)	epaJ	ETT2	100	333	100	0	0	1	333	1	333	0	616
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49245.1_152	735	VFG042092(gi:15832970)	epaK	ETT2	100	735	100	0	0	1	735	1	735	0	1358
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48412.1_28	1539	VFG000819(gi:15804236)	escC	LEE	100	1539	100	0	0	1	1539	1	1539	0	2843
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48395.1_11	1221	VFG000802(gi:15804219)	escD	LEE	100	1221	100	0	0	1	1221	1	1221	0	2255
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48424.1_40	219	VFG000831(gi:15804248)	escE	LEE	100	219	100	0	0	1	219	1	219	4,00E-118	405
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48389.1_5	222	VFG000796(gi:15804213)	escF	LEE	100	222	100	0	0	1	222	1	222	8,00E-120	411
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48388.1_4	279	VFG000795(gi:15804212)	escG	LEE	100	279	100	0	0	1	279	1	279	3,00E-151	516
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48409.1_25	429	VFG000816(gi:15804233)	escI	LEE	100	429	100	0	0	1	429	1	429	0	793
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48410.1_26	573	VFG000817(gi:15804234)	escJ	LEE	100	573	100	0	0	1	573	1	573	0	1059
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48405.1_21	1341	VFG000812(gi:15804229)	escN	LEE	100	1341	100	0	0	1	1341	1	1341	0	2477
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48404.1_20	378	VFG000811(gi:15804228)	escO	LEE	100	378	100	0	0	1	378	1	378	0	699
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48420.1_36	654	VFG000827(gi:15804244)	escR	LEE	100	654	100	0	0	1	654	1	654	0	1208
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48419.1_35	270	VFG000826(gi:15804243)	escS	LEE	100	270	100	0	0	1	270	1	270	3,00E-146	489
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48418.1_34	777	VFG000825(gi:15804242)	escT	LEE	100	777	100	0	0	1	777	1	777	0	1495
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48417.1_33	1038	VFG000824(gi:15804241)	escU	LEE	100	1038	100	0	0	1	1038	1	1038	0	1917

ic INJDB01000014.1_cds_OXL48406.1_22	2028	VFG000813(gi:15804230)	escV	LEE	(escV) Type III secretion system major export apparatus protein [TTSS (VF0191)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2028	100	0	0	1	2028	1	2028	0	3746
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48393.1_9	579	VFG000800(gi:15804217)	espA	LEE	(espA) Type III secretion system translocator protein EspA [EspA (VF0198)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	579	100	0	0	1	579	1	579	0	1070
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48391.1_7	939	VFG012362(gi:15804215)	espB	LEE	(espB) Type III secretion system translocator protein EspB, pore protein [TTSS (VF0191)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	939	100	0	0	1	939	1	939	0	1735
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48392.1_8	1125	VFG000799(gi:15804216)	espD	LEE	(espD) Type III secretion system translocator protein EspD, pore protein [EspD (VF0200)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1125	100	0	0	1	1125	1	1125	0	2078
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48397.1_3	465	VFG033742(gi:387984848)	espF	LEE	(espF) protein EspF [EspF (CVF434)] [Escherichia coli O157:H7 str. Xuzhou21]	100	465	100	0	0	1	465	1	465	0	859
ic INJDB01000032.1_cds_OXL48936.1_75	570	VFG033773(gi:291283154)	espFu / tccP		(espFu/tccP) Tir-cytoskeleton coupling protein [EspFu/tccP (VF439)] [Escherichia coli O55:H7 str. C59615]	99.8	570	100	1	0	1	570	1	570	0	1048
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48426.1_42	1197	VFG000833(gi:15804250)	espG	LEE	(espG) Type III secretion system effector EspG, GTPase activating protein [EspG (VF0201)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1197	100	0	0	1	1197	1	1197	0	2211
ic INJDB01000014.1_cds_OXL48932.1_74	507	VFG000808(gi:15804225)	espH	LEE	(espH) Type III secretion system effector EspH, RhoGEF inhibitor [EspH (VF0197)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	507	100	0	0	1	507	1	507	0	937
ic INJDB01000032.1_cds_OXL48932.1_74	654	VFG012498(gi:15802410)	espJ	T3SS non-LEE	(espJ) Type III secretion system effector EspJ, adenosine diphosphate (ADP) ribosyltransferase [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	654	100	1	0	1	654	1	654	0	1203
ic INJDB01000039.1_cds_OXL46594.1_40	1362	VFG034746(gi:15801299)	espK	T3SS non-LEE	(espK) Type III secretion system effector EspK [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1362	100	0	0	1	1362	1	1362	0	2516
ic INJDB01000004.1_cds_OXL50142.1_152	1899	VFG034755(gi:15831681)	espL1	T3SS non-LEE	(espL1) hypothetical protein [EspL1 (CVF688)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	1899	100	1	0	1	1899	1	1899	0	3502
ic INJDB01000052.1_cds_OXL46196.1_7	1650	VFG034762(gi:15833109)	espL2	SS non-LEE/toxin OI	(espL2) enterotoxin [EspL2 (CVF689)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	99.9	1650	100	1	0	1	1650	1	1650	0	3042
ic INJDB01000031.1_cds_OXL46988.1_56	2187	VFG034772(gi:15804603)	espL4	T3SS non-LEE	(espL4) Type III secretion system effector EspL4 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2187	100	0	0	1	2187	1	2187	0	4039
ic INJDB01000007.1_cds_OXL49605.1_182	591	VFG034778(gi:15801928)	espM1	T3SS non-LEE	(espM1) Type III secretion system effector EspM1, Rho guanine exchange factor [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	591	100	0	0	1	591	1	591	0	1092
ic INJDB01000008.1_cds_OXL49432.1_176	591	VFG034786(gi:15803143)	espM2	T3SS non-LEE	(espM2) Type III secretion system effector EspM2, Rho guanine exchange factor [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	591	100	0	0	1	591	1	591	0	1092
ic INJDB01000039.1_cds_OXL46599.1_46	3402	VFG034796(gi:15830815)	espN	T3SS non-LEE	(espN) hypothetical protein [EspN (CVF693)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	3402	100	0	0	1	3402	1	3402	0	6283
ic INJDB01000039.1_cds_OXL46595.1_41	276	VFG034803(gi:15830821)	espO1-1	T3SS non-LEE	(espO1-1) hypothetical protein [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	276	100	0	0	1	276	1	276	1,00E-149	510
ic INJDB01000007.1_cds_OXL49608.1_185	279	VFG034810(gi:15831075)	espO1-2	T3SS non-LEE	(espO1-2) hypothetical protein [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	279	100	0	0	1	279	1	279	3,00E-151	516
ic INJDB01000056.1_cds_OXL46145.1_8	3903	VFG033820(gi:209395572)	espP	Adhesion/TF5aSS	(espP) immunoglobulin A1 protease domain protein [EspP (CVF447)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	100	3903	100	0	0	1	3903	1	3903	0	7208
ic INJDB01000018.1_cds_OXL47949.1_11	1260	VFG034815(gi:15801668)	espR1	T3SS non-LEE	(espR1) Type III secretion system effector espR1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1260	100	0	0	1	1260	1	1260	0	2327
ic INJDB01000032.1_cds_OXL46892.1_27	1140	VFG034828(gi:209397909)	espR3	T3SS non-LEE	(espR3) hypothetical protein [EspR3 (CVF697)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	100	1140	100	0	0	1	1140	1	1140	0	2106
ic INJDB01000032.1_cds_OXL46933.1_30	240	VFG034834(gi:209397973)	espR4	T3SS non-LEE	(espR4) hypothetical protein [EspR4 (CVF698)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	100	240	100	0	0	1	240	901	1140	5,00E-129	444

ic NJDB01000030.1_cds_OXL46994.1_2	183	VFG034637(gi:15800892)	espV	T3SS non-LEE	(espV) hypothetical protein [EspV (CVF699)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] (espV) Type III secretion system effector EspW [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	183	100	0	0	1	183	1	183	3,00E-98	339
ic NJDB01000008.1_cds_OXL49434.1_178	1059	VFG034840(gi:15803145)	espW	T3SS non-LEE	(espX1) Type III secretion system effector EspX1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1059	100	0	0	1	1059	1	1059	0	1956
ic NJDB01000001.1_cds_OXL50840.1_145	1422	VFG034849(gi:15799704)	espX1	T3SS non-LEE	(espX2) hypothetical protein [EspX2 (CVF702)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1422	100	1	0	1	1422	1	1422	0	2621
ic NJDB01000024.1_cds_OXL47423.1_43	2013	VFG034860(gi:15830130)	espX2	T3SS non-LEE	(espX4) Type III secretion system effector EspX4 [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai] [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2013	100	0	0	1	2013	1	2013	0	3718
ic NJDB01000003.1_cds_OXL46956.1_22	1363	VFG034866(gi:15804631)	espX4	T3SS non-LEE	(espX5) Type III secretion system effector EspX5 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1363	100	0	0	1	1363	199	1581	0	2555
ic NJDB01000046.1_cds_OXL46823.1_4	1293	VFG034873(gi:15804658)	espX5	T3SS non-LEE	(espX6) Type III secretion system effector EspX6 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1293	100	1	0	1	1293	1	1293	0	2363
ic NJDB01000001.1_cds_OXL50753.1_51	2196	VFG034880(gi:15804911)	espX6	T3SS non-LEE	(espX7) secreted effector protein [EspX7 (CVF706)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai] (espY1) Type III secretion system effector EspY1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2196	100	0	0	1	2196	1	2196	0	4056
ic NJDB01000039.1_cds_OXL46600.1_47	2349	VFG034888(gi:15830814)	espX7	T3SS non-LEE	(espY2) Type III secretion system effector EspY2 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2349	100	0	0	1	2349	1	2349	0	4338
ic NJDB01000001.1_cds_OXL50877.1_182	783	VFG034895(gi:15799741)	espY1	T3SS non-LEE	(espY3) Type III secretion system effector EspY3 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	96.2	783	100	0	8	1	783	1	753	0	1253
ic NJDB01000001.1_cds_OXL50888.1_196	570	VFG034901(gi:15799753)	espY2	T3SS non-LEE	(espY4) Type III secretion system effector EspY4 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	570	100	0	0	1	570	1	570	0	1053
ic NJDB01000003.1_cds_OXL50335.1_146	1572	VFG034908(gi:15800148)	espY3	T3SS non-LEE	(espY5) hypothetical protein [EspY5 (CVF711)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] (etgA) T3SS-associated peptidoglycan lytic enzyme [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1572	100	0	0	1	1572	1	1572	0	2904
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48490.1_112	2409	VFG034915(gi:15804313)	espY4	T3SS non-LEE	(etpA) T3SS-associated peptidoglycan lytic enzyme [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2409	100	0	0	1	2409	1	2409	0	4449
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48494.1_116	2385	VFG034922(gi:15804316)	espY5	T3SS non-LEE	(etpC) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2385	100	1	0	1	2385	1	2385	0	4399
ic NJDB01000014.1_cds_OXL48416.1_32	459	VFG000823(gi:15804240)	etpA		(etpD) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	459	100	0	0	1	459	1	459	0	848
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46459.1_3	876	VFG040831(gi:75994478)	etpC	ETT2	(etpE) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	876	100	0	0	1	876	1	876	0	1618
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46486.1_4	1911	VFG040832(gi:75994479)	etpD	ETT2	(etpF) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1911	100	0	0	1	1911	19	1929	0	3530
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46460.1_5	1506	VFG040833(gi:75994480)	etpE	ETT2	(etpG) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1506	100	0	0	1	1506	1	1506	0	2782
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46461.1_6	1224	VFG040834(gi:75994481)	etpF	ETT2	(etpH) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1224	100	0	0	1	1224	1	1224	0	2261
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46462.1_7	435	VFG040835(gi:75994482)	etpG	ETT2	(etpI) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	435	100	0	0	1	435	1	435	0	804
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46463.1_8	555	VFG040836(gi:75994483)	etpH	ETT2	(etpJ) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	555	100	0	0	1	555	1	555	0	1026
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46464.1_9	348	VFG040837(gi:75994484)	etpI	ETT2	(etpK) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	348	100	0	0	1	348	19	366	0	643
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46465.1_10	600	VFG040838(gi:75994485)	etpJ	ETT2	(etpL) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	600	100	0	0	1	600	1	600	0	1109
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46466.1_11	978	VFG040839(gi:75994486)	etpK	ETT2	(etpM) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	978	100	1	0	1	978	1	978	0	1801
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46487.1_12	1173	VFG040840(gi:75994487)	etpL	ETT2	(etpN) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1173	100	0	0	1	1173	106	1278	0	2167
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46467.1_13	513	VFG040841(gi:75994488)	etpM	ETT2	(etpO) type II secretion protein [etp (SS207)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	513	100	0	0	1	513	1	513	0	948
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46468.1_14	834	VFG040842(gi:75994489)	etpN	ETT2	(etpA) transcriptional regulator [ETT2 (SS017)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	834	100	0	0	1	834	1	834	0	1541
ic NJDB01000042.1_cds_OXL46469.1_15	402	VFG040843(gi:75994490)	etpO	ETT2		100	402	100	0	0	1	402	1	402	0	743
ic NJDB01000009.1_cds_OXL49249.1_157	501	VFG042088(gi:15832974)	etpA	ETT2		100	501	100	0	0	1	501	1	501	0	926

kl NJDB01000013.1_cds_OXL48562.1_26	2241	VFG013009(gi:82775861)	fepA	iron	(fepA) outer membrane receptor for ferric enterobactin (enterochelin) and colicins B and D [Enterobactin transport (CVF478)] [Shigella dysenteriae Sc197]	2241	100	20	0	1	2241	1	2241	0	4028
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48561.1_35	957	VFG000924(gi:26246571)	fepB	iron	(fepB) ferrienterobactin ABC transporter periplasmic binding protein [Enterobactin (VFO229)] [Escherichia coli CFT073]	957	100	23	0	1	957	1	957	0	1640
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48567.1_31	816	VFG013021(gi:82775868)	fepC	iron	(fepC) ATP-binding component of ferric enterobactin transport [Enterobactin transport (CVF478)] [Shigella dysenteriae Sc197]	816	100	11	0	1	816	1	816	0	1447
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48559.1_33	1005	VFG013027(gi:82775870)	fepD	iron	(fepD) ferric enterobactin transport [Enterobactin transport (CVF478)] [Shigella dysenteriae Sc197]	1005	100	16	0	1	1005	1	1005	0	1768
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48566.1_30	1134	VFG000927(gi:26246566)	fepE	iron	(fepE) ferric enterobactin transport protein FepE [Enterobactin (VFO228)] [Escherichia coli CFT073]	1134	100	62	0	1	1134	1	1134	0	1751
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48568.1_32	993	VFG013036(gi:110804580)	fepG	iron	(fepG) ferric enterobactin transport protein [Enterobactin transport (CVF478)] [Shigella flexneri 5 str. 8401]	993	100	20	0	1	993	1	993	0	1724
kl NJDB01000013.1_cds_OXL48553.1_27	1203	VFG044159(gi:26246563)	fes	iron	(fes) enterobactin/ferric enterobactin esterase [enterobactin (A019)] [Escherichia coli CFT073]	1203	100	39	0	1	1203	1	1203	0	2006
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50731.1_25	549	VFG033207(gi:209396019)	fimA	Adhesion	(fimA) type-1 fimbrial protein-like protein [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	549	100	0	0	1	549	1	549	0	1014
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50729.1_23	603	VFG012264(gi:15804887)	fimB	Adhesion	(fimB) recombinase involved in phase variation; regulator for fimA [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	603	100	0	0	1	603	1	603	0	1114
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50733.1_27	726	VFG012292(gi:15804891)	fimC	Adhesion	(fimC) periplasmic chaperone, required for type 1 fimbriae [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	726	100	0	0	1	726	1	726	0	1341
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50734.1_28	2637	VFG012300(gi:15834530)	fimD	Adhesion	(fimD) FimD [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	2637	100	0	0	1	2637	1	2637	0	4870
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50730.1_24	597	VFG012271(gi:15804888)	fimE	Adhesion	(fimE) recombinase involved in phase variation; regulator for fimA [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	597	100	0	0	1	597	1	597	0	1103
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50735.1_29	531	VFG012306(gi:15804893)	fimF	Adhesion	(fimF) fimbrial morphology [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	531	100	0	0	1	531	1	531	0	981
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50736.1_30	504	VFG012313(gi:15804894)	fimG	Adhesion	(fimG) fimbrial morphology [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	504	100	0	0	1	504	1	504	0	931
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50737.1_31	903	VFG033355(gi:291285701)	fimH	Adhesion	(fimH) adhesin [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615]	903	100	1	0	1	903	1	903	0	1663
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50732.1_26	540	VFG033229(gi:254796317)	fimI	Adhesion	(fimI) type 1 pilus biosynthesis fimbrial protein [Type 1 fimbriae (CVF426)] [Escherichia coli O157:H7 str. TW14359]	540	100	0	0	1	540	1	540	0	998
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47781.1_56	660	VFG043073(gi:15801189)	flgA	flagella	(flgA) flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	660	100	0	0	1	660	1	660	0	1219
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47782.1_57	417	VFG043074(gi:15801190)	flgB	flagella	(flgB) flagellar basal body rod protein FlgB [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	417	100	0	0	1	417	1	417	0	771
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47783.1_58	405	VFG043075(gi:15801191)	flgC	flagella	(flgC) flagellar basal body rod protein FlgC [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	405	100	0	0	1	405	1	405	0	749
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47784.1_59	696	VFG043076(gi:15801192)	flgD	flagella	(flgD) flagellar basal body rod modification protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	696	100	2	0	1	696	1	696	0	1279
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47785.1_60	1206	VFG043077(gi:15801193)	flgE	flagella	(flgE) flagellar hook protein FlgE [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	1206	100	0	0	1	1206	1	1206	0	2228
kl NJDB01000020.1_cds_OXL47786.1_61	756	VFG043078(gi:15801194)	flgF	flagella	(flgF) flagellar basal body rod protein FlgF [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	756	100	1	0	1	756	1	756	0	1391

ic NJ000001000020.1_cds_OXL47787.1_62	783	VFG043079(gi:5801195)	figG	flagella	(figG) flagellar basal body rod protein FigG [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	783	100	1	0	1	783	1	783	0	1443
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47788.1_63	699	VFG043080(gi:5801196)	figH	flagella	(figH) flagellar basal body L-ring protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	699	100	0	0	1	699	1	699	0	1291
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47789.1_64	1098	VFG043081(gi:5801197)	figI	flagella	(figI) flagellar basal body P-ring protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1098	100	0	0	1	1098	1	1098	0	2028
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47790.1_65	942	VFG043082(gi:5801198)	figJ	flagella	(figJ) flagellar rod assembly protein/muramidase FigJ [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	942	100	0	0	1	942	1	942	0	1740
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47791.1_66	1644	VFG043083(gi:5801199)	figK	flagella	(figK) flagellar hook-associated protein FigK [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1644	100	2	0	1	1644	1	1644	0	3029
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47792.1_67	954	VFG043084(gi:5801200)	figL	flagella	(figL) flagellar hook-associated protein FigL [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	954	100	0	0	1	954	1	954	0	1762
ic NJ000001000020.1_cds_OXL47793.1_68	417	VFG043085(gi:5801187)	figN	flagella	(figN) flagella synthesis protein FigN [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	417	100	0	0	1	417	1	417	0	771
ic NJ000001000015.1_cds_OXL48361.1_121	2079	VFG043086(gi:5802291)	flhA	flagella	(flhA) flagellar biosynthesis protein FlhA [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	2079	100	0	0	1	2079	1	2079	0	3840
ic NJ000001000015.1_cds_OXL48362.1_122	1149	VFG043087(gi:5802292)	flhB	flagella	(flhB) flagellar biosynthesis protein FlhB [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1149	100	1	0	1	1149	1	1149	0	2119
ic NJ000001000015.1_cds_OXL48373.1_133	579	VFG043089(gi:5802303)	flhC	flagella	(flhC) transcriptional activator FlhC [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	579	100	0	0	1	579	1	579	0	1070
ic NJ000001000015.1_cds_OXL48374.1_134	351	VFG043098(gi:5802304)	flhD	flagella	(flhD) transcriptional activator FlhD [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	351	100	0	0	1	351	10	360	0	649
ic NJ000001000015.1_cds_OXL48360.1_120	393	VFG043095(gi:5802290)	flhE	flagella	(flhE) flagellar protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	393	100	0	0	1	393	1	393	0	726
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46881.1_14	720	VFG043101(gi:5802357)	flhA	flagella	(flhA) flagellar biosynthesis sigma factor [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	720	100	0	0	1	720	1	720	0	1330
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46882.1_15	1758	VFG043102(gi:5802356)	flhC	flagella	(flhC) flagellin [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1758	100	1	0	1	1758	1	1758	0	3243
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46883.1_17	1398	VFG043103(gi:5802359)	flhD	flagella	(flhD) flagellar capping protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1398	100	0	0	1	1398	1	1398	0	2562
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46895.1_33	315	VFG043106(gi:5802372)	flhE	flagella	(flhE) flagellar hook-basal body protein FlhE [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	315	100	0	0	1	315	1	315	3,00E-171	582
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46896.1_35	996	VFG043108(gi:5802374)	flhG	flagella	(flhG) flagellar motor switch protein G [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	996	100	1	0	1	996	1	996	0	1836
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46897.1_36	667	VFG043109(gi:5802375)	flhH	flagella	(flhH) flagellar assembly protein H [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	667	100	0	0	1	667	1	667	0	1269
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46898.1_37	1374	VFG043110(gi:5802376)	flhI	flagella	(flhI) flagellum-specific ATP synthase [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1374	100	0	0	1	1374	1	1374	0	2538
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46899.1_38	444	VFG043111(gi:5802377)	flhJ	flagella	(flhJ) flagellar biosynthesis chaperone [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	444	100	0	0	1	444	1	444	0	821
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46900.1_39	1128	VFG043112(gi:5802378)	flhK	flagella	(flhK) flagellar hook-length control protein [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.7	1128	100	3	0	1	1128	1	1128	0	2073
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46901.1_40	465	VFG043113(gi:5802379)	flhL	flagella	(flhL) flagellar basal body-associated protein FlhL [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	465	100	0	0	1	465	1	465	0	859
ic NJ000001000032.1_cds_OXL46902.1_41	1005	VFG043114(gi:5802380)	flhM	flagella	(flhM) flagellar motor switch protein FlhM [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99.9	1005	100	1	0	1	1005	1	1005	0	1853



klj NJDB01000032.1_cds_OXL46903.1_42	414	VFG043115(gi:15602361)	flIN	flagella	flIN	100	414	100	0	0	1	414	1	414	0	765
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46904.1_43	366	VFG043116(gi:161367586)	flIO	flagella	flIO	100	366	100	0	0	1	366	1	366	0	676
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46905.1_44	738	VFG043117(gi:15602363)	flIP	flagella	flIP	100	738	100	0	0	1	738	1	738	0	1363
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46906.1_45	270	VFG043118(gi:15602364)	flIQ	flagella	flIQ	100	270	100	0	0	1	270	1	270	3.00E-146	499
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46907.1_46	786	VFG043119(gi:15602365)	flIR	flagella	flIR	100	786	100	0	0	1	786	1	786	0	1452
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46984.1_18	411	VFG043104(gi:15602360)	flIS	flagella	flIS	99.5	411	100	2	0	1	411	1	411	0	752
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46985.1_19	366	VFG043105(gi:15602361)	flIT	flagella	flIT	100	366	100	0	0	1	366	1	366	0	676
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46979.1_12	801	VFG043099(gi:15602355)	flIY	flagella	flIY	100	801	100	0	0	1	801	1	801	0	1480
klj NJDB01000032.1_cds_OXL46980.1_13	552	VFG043100(gi:15602356)	flIZ	flagella	flIZ	99.8	552	100	1	0	1	552	37	588	0	1014
klj NJDB01000010.1_cds_OXL49021.1_75	996	VFG043120(gi:15602868)	flk	flagella	flk	100	996	100	0	0	1	996	1	996	0	1840
klj NJDB01000013.1_cds_OXL46642.1_122	447	VFG000479(gi:16764063)	tur	iron	tur	86.3	437	97,76286	51	0	1	437	1	437	1,00E-153	525
klj NJDB01000014.1_cds_OXL46414.1_30	414	VFG000821(gi:15604238)	gfrA	LEE	gfrA	100	414	100	0	0	1	414	1	414	0	765
klj NJDB01000014.1_cds_OXL48415.1_31	372	VFG000822(gi:15604239)	gfrR	LEE	gfrR	100	372	100	0	0	1	372	1	372	0	688
klj NJDB01000038.1_cds_OXL46608.1_4	519	VFG035808(gi:15799915)	hcp	T6SS	hcp	100	519	100	0	0	1	519	1	519	0	959
klj NJDB01000042.1_cds_OXL46471.1_20	2997	VFG000840(gi:75994494)	hyA	toxin	hyA	100	2997	100	0	0	1	2997	1	2997	0	5635
klj NJDB01000042.1_cds_OXL46472.1_21	2121	VFG000841(gi:75994495)	hyB	toxin	hyB	100	2121	100	0	0	1	2121	1	2121	0	3917
klj NJDB01000042.1_cds_OXL46470.1_19	492	VFG012489(gi:10955282)	hyC	toxin	hyC	100	492	100	0	0	1	492	1	492	0	909
klj NJDB01000042.1_cds_OXL46473.1_22	1440	VFG000843(gi:75994496)	hyD	toxin	hyD	100	1440	100	0	0	1	1440	1	1440	0	2660
klj NJDB01000060.1_cds_OXL45912.1_4	2148	VFG044171(gi:26248334)	hma	iron	hma	99.6	2148	100	9	0	1	2148	1	2148	0	3917
klj NJDB01000001.1_cds_OXL50925.1_234	1386	VFG042799(gi:15799791)	hopB / hopB	Adhesion	hopB / hopB	100	1386	100	0	0	1	1386	1	1386	0	2560
klj NJDB01000001.1_cds_OXL50924.1_233	1203	VFG042798(gi:15799790)	hopC / hopC	Adhesion	hopC / hopC	100	1203	100	0	0	1	1203	1	1203	0	2222
klj NJDB01000009.1_cds_OXL49240.1_147	504	VFG042094(gi:15632965)	lagB	ETT2	lagB	99.8	402	79,7619	1	0	103	504	1	402	0	737
klj NJDB01000013.1_cds_OXL46540.1_11	1383	VFG034852(gi:15600285)	ibeB		ibeB	100	1383	100	0	0	1	1383	1	1383	0	2555

1734	VFG034688(gi:15834138)	ibeC	toxin/adhesion	(ibeC) hypothetical protein [CFA/I fimbriae (CVF684)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	1734	100	0	0	1	1734	1	1734	0	3203
1269	VFG012874(gi:30064027)	ipaH		(ipaH) hypothetical protein [Mxi-Spa TTSS effectors controlled by MxiE (CVF465)] [Shigella flexneri 2a str. 2457T]	96,7	1269	100	42	0	1	1269	67	1335	0	2111
336	VFG012837(gi:182524546)	ipaH2.5		(ipaH2.5) invasion plasmid antigen, fragment [Mxi-Spa TTSS effectors controlled by MxiE (CVF465)] [Shigella dysenteriae Sd197]	94,3	333	99,10714	19	0	4	336	1213	1545	9,00E-149	510
390	VFG000832(gi:15804249)	ler	LEE	(ler) hypothetical protein [Ler (VFO192)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	390	100	0	0	1	390	1	390	0	721
2178	VFG034928(gi:291284300)	lflA / eta 1		(lflA/eta1) EHEC factor for adherence [LflA/eta1 (CVF712)] [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615]	100	2129	97,75023	1	0	1	2129	1	2129	0	3927
612	VFG000806(gi:15804223)	map	LEE	(map) Type III secretion system effector Map, Rho guanine exchange factor [Map (VFO195)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	612	100	0	0	1	612	1	612	0	1131
888	VFG043096(gi:15802302)	motA	flagella	(motA) flagellar motor protein MotA [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	888	100	0	0	1	888	1	888	0	1640
927	VFG043095(gi:15802301)	motB	flagella	(motB) flagellar motor protein MotB [peritrichous flagella (A1140)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	99,9	927	100	1	0	1	927	1	927	0	1707
1326	VFG002121(gi:15801940)	nleA / espl	T3SS non-LEE	(nleA/espl) Type III secretion system effector nleA [NleA/Espl (VFO308)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	1326	100	0	0	1	1326	1	1326	0	2449
990	VFG034932(gi:15803520)	nleB1	T3SS non-LEE	(nleB1) Type III secretion system effector nleB1 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	990	100	0	0	1	990	1	990	0	1829
981	VFG034942(gi:15800520)	nleB2	T3SS non-LEE	(nleB2) Type III secretion system effector NleB2 [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	981	100	0	0	1	981	1	981	0	1812
126	VFG034951(gi:291281154)	nleB2-2	T3SS non-LEE O136	(nleB2-2) NleB [NleB2-2 (CVF715)] [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615]	97,4	114	90,47619	3	0	13	126	868	981	2,00E-54	195
993	VFG002122(gi:15800521)	nleC	T3SS non-LEE	(nleC) Type III secretion system effector NleC, zinc metalloprotease [NleC (VFO340)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	993	100	0	0	1	993	1	993	0	1834
899	VFG012445(gi:15830104)	nleD	T3SS non-LEE	(nleD) hypothetical protein [NleD (CVF444)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	899	100	0	0	1	699	1	699	0	1291
675	VFG034954(gi:15803521)	nleE	T3SS non-LEE	(nleE) Type III secretion system effector NleE [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	675	100	0	0	1	675	1	675	0	1247
570	VFG034966(gi:15801937)	nleF	T3SS non-LEE	(nleF) Type III secretion system effector NleF, caspase inhibitor [LEE encoded T3SS (SS020)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	570	100	0	0	1	570	1	570	0	1053
648	VFG034975(gi:15801928)	nleG-1	T3SS non-LEE	(nleG-1) hypothetical protein [NleG-1 (CVF719)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	648	100	0	0	1	648	1	648	0	1197
573	VFG035008(gi:209400919)	nleG-3	T3SS non-LEE	(nleG-3) non-LEE-encoded effector NleG [NleG-3 (CVF724)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	99,8	573	100	1	0	1	573	1	573	0	1053
576	VFG034992(gi:15801586)	nleG2-3	T3SS non-LEE	(nleG2-3) hypothetical protein [NleG2-3 (CVF723)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	576	100	0	0	1	576	1	576	0	1064
435	VFG035012(gi:15801754)	nleG5-1	T3SS non-LEE O167	(nleG5-1) hypothetical protein [NleG5-1 (CVF725)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	100	435	100	0	0	1	435	208	642	0	804
642	VFG035022(gi:209400956)	nleG5-2	T3SS non-LEE	(nleG5-2) hypothetical protein [NleG5-2 (CVF726)] [Escherichia coli O157:H7 str. EC4115]	99,8	642	100	1	0	1	642	1	642	0	1181
202	VFG035028(gi:387506605)	nleG6-1	T3SS non-LEE	(nleG6-1) T3SS secreted effector NleG-like protein [NleG6-1 (CVF727)] [Escherichia coli O55:H7 str. RMT2579]	100	202	100	0	0	1	202	1	202	3,00E-108	374
630	VFG035033(gi:15831408)	nleG6-2	T3SS non-LEE	(nleG6-2) hypothetical protein [NleG6-2 (CVF728)] [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	100	630	100	0	0	1	630	1	630	0	1164

kl NJDB010000206.1_cds_OXL45610.1_1	288	VFG035038(gi:15832742)	nleG6-3	T3SS non-LEE	nleG6-3	288	100	288	0	0	1	288	1	288	4,00E-156	532
kl NJDB010000054.1_cds_OXL46179.1_4	372	VFG035051(gi:260867989)	nleG7	T3SS non-LEE	nleG7	372	100	372	1	0	1	372	280	651	0	682
kl NJDB010000008.1_cds_OXL49433.1_177	651	VFG035053(gi:15803144)	nleG8-2	T3SS non-LEE	nleG8-2	651	100	651	0	0	1	651	1	651	0	1203
kl NJDB01000024.1_cds_OXL47450.1_72	882	VFG035062(gi:15800522)	nleH1	T3SS non-LEE	nleH1	882	100	882	0	0	1	882	1	882	0	1629
kl NJDB01000064.1_cds_OXL46037.1_3	912	VFG035073(gi:15801938)	nleH2	T3SS non-LEE	nleH2	912	100	912	0	0	1	912	1	912	0	1685
kl NJDB01000016.1_cds_OXL48205.1_67	1089	VFG043566(gi:16764916)	ompD		ompD	975	89,53186	193	49	76	1015	73	1006	3,00E-67	241	
kl NJDB01000014.1_cds_OXL48422.1_38	600	VFG000823(gi:15804246)	orf4	LEE	orf4	600	100	600	0	0	1	600	1	600	0	1109
kl NJDB01000009.1_cds_OXL49244.1_151	582	VFG042091(gi:15832969)	orgA	ETT2	orgA	582	100	582	1	0	1	582	1	582	0	1070
kl NJDB01000009.1_cds_OXL49242.1_149	432	VFG042093(gi:15832967)	orgB	ETT2	orgB	432	100	432	0	0	1	432	1	432	0	798
kl NJDB01000009.1_cds_OXL49263.1_172	180	VFG042074(gi:15832959)	pkgA	ETT2	pkgA	180	100	180	0	0	1	180	1	180	1,00E-96	333
kl NJDB01000001.1_cds_OXL50926.1_235	441	VFG042800(gi:15799792)	ppdD / hcpA	Adhesion	ppdD / hcpA	441	100	441	0	0	1	441	1	441	0	815
kl NJDB01000009.1_cds_OXL49122.1_26	993	VFG000477(gi:16766230)	rpoS		rpoS	993	100	993	69	2	2	993	2	993	0	1439
kl NJDB01000014.1_cds_OXL48411.1_27	456	VFG000818(gi:15804235)	sepD	LEE	sepD	456	100	456	0	0	1	456	1	456	0	843
kl NJDB01000014.1_cds_OXL48394.1_10	1056	VFG000801(gi:15804218)	sepL	LEE	sepL	1056	100	1056	0	0	1	1056	1	1056	0	1951
kl NJDB01000014.1_cds_OXL48402.1_18	918	VFG000809(gi:15804226)	sepQ / escQ	LEE	sepQ / escQ	918	100	918	0	0	1	918	1	918	0	1696
kl NJDB01000014.1_cds_OXL48408.1_24	300	VFG000815(gi:15804232)	sepZ / espZ	LEE	sepZ / espZ	300	100	300	0	0	1	300	1	300	7,00E-163	555
kl NJDB01000019.1_cds_OXL47865.1_25	771	VFG013070(gi:82778664)	shuV	iron	shuV	771	100	771	9	0	1	771	1	771	0	1375
kl NJDB01000042.1_cds_OXL46458.1_2	2697	VFG000846(gi:75994477)	stcE		stcE	2697	100	2697	0	0	1	2697	1	2697	0	4981
kl NJDB01000079.1_cds_OXL45917.1_4	948	VFG033850(gi:260854747)	stx1A	toxin	stx1A	948	100	948	0	0	1	948	10	957	0	1751
kl NJDB01000078.1_cds_OXL45926.1_4	960	VFG043753(gi:158185969)	stx2A	toxin	stx2A	960	100	960	6	0	1	960	1	960	0	1740
kl NJDB01000078.1_cds_OXL45925.1_3	270	VFG043756(gi:22001099)	stx24B	toxin	stx24B	270	100	270	0	0	1	270	1	270	3,00E-146	499
kl NJDB01000078.1_cds_OXL45916.1_3	270	VFG001829(gi:82776677)	stxB	toxin	stxB	270	100	270	0	0	1	270	1	270	3,00E-146	499
kl NJDB01000015.1_cds_OXL48368.1_128	1662	VFG043092(gi:15802298)	tar / cheM	flagella	tar / cheM	1662	100	1662	1	0	1	1662	1	1662	0	3066
kl NJDB01000023.1_cds_OXL45580.1_2	147	VFG034740(gi:15830379)	tcsp2		tcsp2	147	100	147	0	0	1	147	424	570	7,00E-78	272

1659	VF0000805(gi:15804222)	tlr	LEE	98,9	1677	101,085	0	6	1	1659	1	1677	0	2981
9510	VF0033076(gi:387865662)	toxB		100	9510	100	1	0	1	9510	1	9510	0	1,78E+04
4767	VF0035942(gi:15833734)	upaG / ehaG	Adhesion	100	4767	100	0	0	1	4767	1	4767	0	8804
2142	VF0041051(gi:15799916)	vgfG	T6SS	99,9	2142	100	2	0	1	2142	1	2142	0	3945
540	VF0042398(gi:15800799)	ycbQ	Adhesion	100	540	100	0	0	1	540	10	549	0	998
702	VF0042399(gi:15800800)	ycbR	Adhesion	100	702	100	0	0	1	702	1	702	0	1297
1071	VF0042401(gi:15800801)	ycbT	Adhesion	100	978	91,31653	0	0	1	978	1	978	0	1807
528	VF0042402(gi:15800802)	ycbU	Adhesion	100	477	90,34091	0	0	52	528	1	477	0	881
516	VF0042403(gi:15800803)	ycbV	Adhesion	99,8	516	100	1	0	1	516	49	564	0	950
492	VF0042096(gi:15832962)	ygeG	ETT2	100	492	100	0	0	1	492	1	492	0	909
1377	VF0042097(gi:15832963)	ygeH	ETT2	100	1377	100	0	0	1	1377	1	1377	0	2543
225	VF0041049(gi:15799912)	Z0263	T6SS	100	225	100	0	0	1	225	1	225	2,00E-121	416
1041	VF0043544(gi:15800816)	ompA		100	1041	100	0	0	1	1041	1	1041	0	1923
564	VF0042713(gi:15801631)	Z2200	Adhesion	99,8	564	100	1	0	1	564	1	564	0	1038
720	VF0042714(gi:15801632)	Z2201	Adhesion	100	720	100	0	0	1	720	1	720	0	1330
2652	VF0042715(gi:15801633)	Z2203	Adhesion	100	2652	100	0	0	1	2652	1	2652	0	4898
531	VF0042716(gi:15801634)	Z2204	Adhesion	100	531	100	0	0	1	531	1	531	0	981
504	VF0042717(gi:15801635)	Z2205	Adhesion	100	504	100	0	0	1	504	1	504	0	931
915	VF0042718(gi:15801636)	Z2206	Adhesion	100	915	100	0	0	1	915	1	915	0	1690
819	VF0000834(gi:15804251)	Z5143	LEE	100	819	100	0	0	1	819	1	819	0	1513

**Supplementary Table 4. Stress fitness genes tested in this study (relative RT-qPCR)**

Gene	Protein or function
<i>acrA</i>	Multidrug efflux pump subunit (antibiotic and drug resistance)
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (oxydative stress)
<i>bolA</i>	Protein BolA (carbon starvation; heat shock; osmotic, oxidative and acid stresses)
<i>chaB*</i>	Cation transport regulator (salinity stress)
<i>clpA*</i>	Chaperone ClpA, ATP-binding component of serine protease (degradation of abnormal protein)
<i>cspA</i>	Cold shock protein CspA (temperature stress)
<i>cspD*</i>	Cold shock protein CspD (temperature stress)
<i>dps*</i>	DNA binding protein DpS (nutritional deprivation; oxydative stress)
<i>ecnA</i>	Antidote lipoprotein EcnA (programmed cells death under starvation conditions) (TA system)
<i>ecnB</i>	Bacteriolytic lipoprotein EcnB (programmed cells death under starvation conditions) (TA system)
<i>elaB</i>	Membrane protein ElaB (multiple stress response)
<i>gabD</i>	Succinate-semialdehydedehydrogenase (putrescine metabolism)
<i>gadA</i>	Glutamate decarboxylase (acid and osmotic stresses; anaerobic phosphate starvation)
<i>gadE</i>	Transcriptional activator GadE (acid stress; pH homeostasis; anaerobic phosphate starvation)
<i>ghoS</i>	Antitoxin GhoS (chemical stresses) (TA system)
<i>ghoT</i>	Toxin GhoT (chemical stresses) (TA system)
<i>grpE</i>	Nucleotide exchange factors GrpE (heat and hyperosmotic shocks)
<i>hchA</i>	Hsp31 Chaperone periplasmic protein (acid stress; heat shock; starvation; osmotic stress)
<i>hdeB</i>	Periplasmic chaperone HdeB (acid stress)
<i>hicA</i>	Toxin HicA (amino acid and glucose starvation) (TA system)
<i>hicB</i>	Antitoxin HicB (amino acid and glucose starvation) (TA system)
<i>htrA</i>	Protease HtrA (temperature and oxydativestresses)
<i>hyaA</i>	Uptake hydrogenase small subunit precursor (starvation)
<i>katE</i>	Catalase (peroxide damage; oxydative and osmotic stresses)
<i>mazE</i>	Antitoxin MazE (high temperatures; DNA damage; oxidative stress) (TA system)
<i>mazF</i>	Toxin MazF (high temperatures; DNA damage; oxidative stress) (TA system)
<i>mdtE</i>	Multidrug resistance subunit MdtE (nitrosatedammages)
<i>osmC*</i>	Protein OsmC (osmotic stress)
<i>osmY*</i>	Protein OsmY (osmotic stress)
<i>otsB</i>	Trehalose-6-phosphate phosphatase (smotic stress; sucrose starch)

<i>poxB</i>	Pyruvate oxidase (osmotic stress; phosphate starvation )
<i>psiF</i>	Protein Psi (phosphate starvation)
<i>relE</i>	Toxin RelE (amino acid; glucose and nitrogen starvation)
<i>rpoS</i>	$\sigma$ 38 subunit RNA Polymerase RpoS (general stress response)
<i>slp</i>	LipoproteinSlp (carbonstarvation; phosphorus limitation)
<i>speA</i>	Arginine decarboxylase (acid resistance)
<i>sspA</i>	Stringent starvation protein A (acid resistance)
<i>sugE</i>	Protein SugE (resistance to quaternary ammonium compound; multidrug efflux pump)
<i>terE</i>	Protein TerE (tellurium resistance)
<i>uspA*</i>	Protein UspA (universal stress response)
<i>yciE</i>	YciE/YciF family protein (osmotic stress)
<i>yehX</i>	ABC transporter ATP-binding subunit YehX (osmotic stress)
<i>yehY</i>	Transporter permease protein YehY (osmotic stress)
<i>ygiW/gadW</i>	Protein YgiW (GadW) (hydrogen peroxide acid stress)
<i>yggE</i>	Protein YggE (oxydative stress; response to tellurite toxicity)
<i>yhiO</i>	Protein YhiO (glucose, nitrogen and phosphate starvation; osmotic and oxidative stresses)
<i>yhiU</i>	Proteins YhiU (acid stress; multidrug efflux pump)
<i>yhiV/cmeB</i>	Inner membrane transporter CmeB (acid stress; multidrug efflux pump)

\* Stress fitness genes preferentially expressed in *E. coli* O157:H7 strains with the bovine-biased genotype (Vanaja et al. 2010)

## II.4. Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract



Audrey Segura, Pauline Auffret, Christophe Klopp, Yolande Bertin and Evelyne Forano

### Abstract

*Escherichia coli* is the most abundant facultative anaerobic bacteria in the gastro-intestinal tract of mammals but can be responsible for intestinal infection due to acquisition of virulence factors. Genomes of pathogenic *E. coli* strains are widely described whereas those of bovine commensal *E. coli* strains are very scarce. Here, we report the genome sequence, annotation, and features of the commensal *E. coli* BG1 isolated from the gastro-intestinal tract of cattle. Whole genome sequencing analysis showed that BG1 has a chromosome of 4,782,107 bp coding for 4465 proteins and 97 RNAs. *E. coli* BG1 belonged to the serotype O159:H21, was classified in the phylogroup B1 and possessed the genetic information encoding “virulence factors” such as adherence systems, iron acquisition and flagella synthesis. A total of 12 adherence systems were detected reflecting the potential ability of BG1 to colonize different segments of the bovine gastrointestinal tract. *E. coli* BG1 is unable to assimilate ethanolamine that confers a nutritional advantage to some pathogenic *E. coli* in the bovine gastro-intestinal tract. Genome analysis revealed the presence of i) 34 amino acids change due to non-synonymous SNPs among the genes encoding ethanolamine transport and assimilation, and ii) an additional predicted alpha helix inserted in cobalamin adenosyltransferase, a key enzyme required for ethanolamine assimilation. These modifications could explain the incapacity of BG1 to use ethanolamine. The BG1 genome can now be used as a reference (control strain) for subsequent evolution and comparative studies.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Commensal, Bovine, Gastro-intestinal tract, Whole genome sequencing, Virulence factors, Ethanolamine





EXTENDED GENOME REPORT

Open Access



# Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* strain BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract

Audrey Segura<sup>1\*</sup>, Pauline Auffret<sup>1†</sup>, Christophe Klopp<sup>2</sup>, Yolande Bertin<sup>1</sup> and Evelyne Forano<sup>1</sup>

## Abstract

*Escherichia coli* is the most abundant facultative anaerobic bacteria in the gastro-intestinal tract of mammals but can be responsible for intestinal infection due to acquisition of virulence factors. Genomes of pathogenic *E. coli* strains are widely described whereas those of bovine commensal *E. coli* strains are very scarce. Here, we report the genome sequence, annotation, and features of the commensal *E. coli* BG1 isolated from the gastro-intestinal tract of cattle. Whole genome sequencing analysis showed that BG1 has a chromosome of 4,782,107 bp coding for 4465 proteins and 97 RNAs. *E. coli* BG1 belonged to the serotype O159:H21, was classified in the phylogroup B1 and possessed the genetic information encoding “virulence factors” such as adherence systems, iron acquisition and flagella synthesis. A total of 12 adherence systems were detected reflecting the potential ability of BG1 to colonize different segments of the bovine gastro-intestinal tract. *E. coli* BG1 is unable to assimilate ethanolamine that confers a nutritional advantage to some pathogenic *E. coli* in the bovine gastro-intestinal tract. Genome analysis revealed the presence of i) 34 amino acids change due to non-synonymous SNPs among the genes encoding ethanolamine transport and assimilation, and ii) an additional predicted alpha helix inserted in cobalamin adenosyltransferase, a key enzyme required for ethanolamine assimilation. These modifications could explain the incapacity of BG1 to use ethanolamine. The BG1 genome can now be used as a reference (control strain) for subsequent evolution and comparative studies.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Commensal, Bovine, Gastro-intestinal tract, Whole genome sequencing, Virulence factors, Ethanolamine

## Introduction

*Escherichia coli* is a common inhabitant of the gastro-intestinal tract of humans and animals [1]. In particular, *E. coli* is typically the most common facultative anaerobe in the lower intestine of mammals and its presence in the environment is usually considered to reflect fecal contamination [1, 2]. The *E. coli* population is multiclonal and fluctuates in its predominance depending on diet, exposure to antibiotics or interactions with the host endogenous microbiota [1].

The intestinal microbiota predominantly comprises strict anaerobic bacteria, especially in the colon. *E. coli* exists in a symbiotic relationship with strict anaerobes: *E. coli* ferments monosaccharides generated by the degradation of polysaccharides by anaerobes (*E. coli* being unable to synthesize the necessary hydrolase enzymes) and in turn, *E. coli* is able to consume oxygen and therefore to favor the strict anaerobe multiplication by creating a more anaerobic environment [2, 3]. Similarly, the host-*E. coli* relationship is mutualistic: the intestinal environment promotes efficient *E. coli* survival and multiplication and in turn, the *E. coli* population produces vitamins K and B12, which are required by mammalian hosts, and competitively excludes pathogens from the host intestinal tract [2]. *E. coli* strains are able to colonize various locations in the mammalian gastro-

\* Correspondence: audrey.segura@inra.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

intestinal tract, but they are mainly found on the mucus layer used by *E. coli* as an essential nutritional source [4]. Successful colonization of the gastro-intestinal tract by *E. coli* depends upon several factors: competition for nutrients with the autochthonous microbiota, production of adhesins to bring the bacteria closer to the epithelia, penetration of the mucus layer, rapid growth and biofilm formation ability [1, 2, 4]. If *E. coli* growth does not exceed the turnover rate of the mucus layer, the bacterial cells are sloughed off into the intestine lumen and then eliminated in the feces [4]. Therefore, *E. coli* must display metabolic flexibility and grow in biofilm in order to succeed in this very competitive biotope [4].

Although considered as commensal in the mammalian gut, *E. coli* also causes a broad range of intestinal or extra-intestinal diseases due to the acquisition of mobile genetic elements encoding virulence factors. Among pathogenic *E. coli*, STEC is the major food-borne pathogen responsible for hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome [5]. In particular, a STEC strain subgroup EHEC belonging mostly to the serotype O157:H7 is responsible for serious public health concern and financial burden [5]. STEC strains are mainly transmitted to humans through contaminated meat or unpasteurized milk consumption [6]. It is of interest to note that healthy ruminants, mainly cattle, are the principal reservoir for *E. coli* O157:H7 strains, but cattle lack the Shiga-toxin vascular receptor, which explains why they are Shiga-toxin tolerant [6].

The cost of whole genome sequencing has decreased drastically and it is now possible to sequence a large number of isolates and use bioinformatic approaches to extract strain relatedness and gene carriage data. *E. coli* strains involved in human infections have been extensively studied and many whole genome sequences of *E. coli* associated with human illness are now available, allowing exploration of pathogenicity processes and identification of virulence factors. Due to cattle STEC dissemination, a significant number of whole genomes of *E. coli* O157:H7 strains isolated from bovine have also been sequenced. While previous genome sequencing efforts with commensal intestinal *E. coli* have focused on human strains [7–9], such data are scarce concerning commensal *E. coli* strains isolated from the bovine gastro-intestinal tract. It would be valuable to have recent and reliable genomic data on bovine commensal strains to be used as reference genomes.

In this study, we report the draft genome sequence and preliminary functional annotation of the commensal *E. coli* strain BG1 isolated from the digestive tract of a cow. The strain BG1 has been previously included in studies concerning the adaptation of pathogenic and commensal *E. coli* strains in the bovine gastro-intestinal tract [10, 11]. This study aimed to characterize the

genomic features of the BG1 strain in order to provide information for future genomic scale (whole genome) comparative analyses. The organism is not part of a larger genomic survey project.

## Organism information

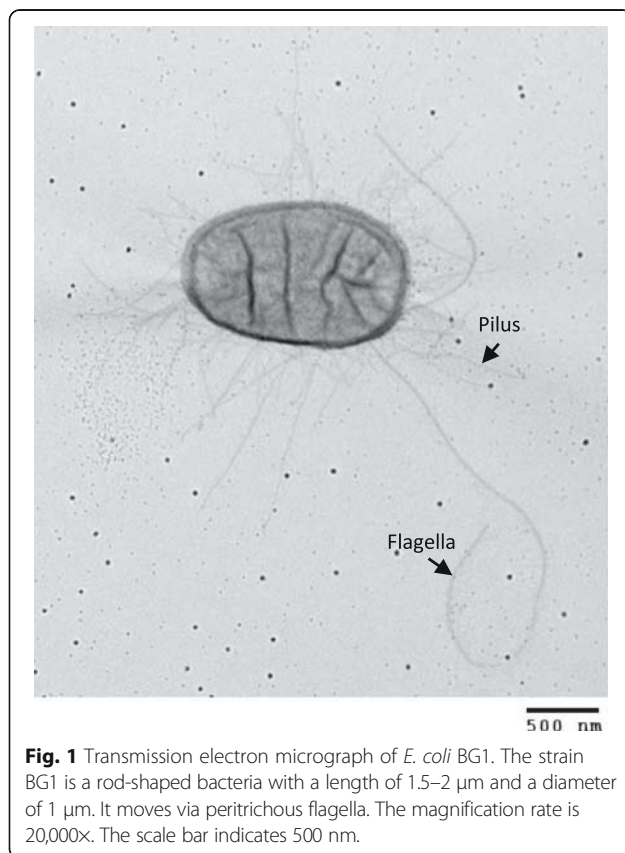
### Classification and features

As described for the genus *Escherichia*, *E. coli* BG1 is a Gram-negative, rod-shaped bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* family (Table 1). *E. coli* is a facultative anaerobe that is motile by means of flagella (Fig. 1). *E. coli* strains are typically able to grow over a wide temperature range (15–48 °C) with optimum growth

**Table 1** Classification and general features of *E. coli* BG1 [58]

MIGS ID	Property	Term	Evidence code <sup>a</sup>	
	Classification	Domain <i>Bacteria</i>	TAS [59]	
		Phylum <i>Proteobacteria</i>	TAS [60]	
		Class <i>Gammaproteobacteria</i>	TAS [61, 62]	
		Order " <i>Enterobacteriales</i> "	TAS [63]	
		Family <i>Enterobacteriaceae</i>	TAS [64, 65]	
		Genus <i>Escherichia</i>	TAS [66, 67]	
		Species <i>Escherichia coli</i>	TAS [66, 67]	
		Gram stain	Negative	IDA, TAS [1]
		Cell shape	Rod	IDA, TAS [1]
	Motility	Motile	TAS [1]	
	Sporulation	None	TAS [1]	
	Temperature range	≈ 15–48 °C	TAS [1]	
	Optimum temperature	37–42 °C	TAS [1]	
	pH range; Optimum	5.5–8.0; 7	TAS [1]	
	Carbon source	Carbohydrates, amino acids	IDA, TAS [1]	
MIGS-6	Habitat	Bovine digestive tract	IDA	
MIGS-6.3	Salinity	Not reported		
MIGS-22	Oxygen requirement	Facultative anaerobe	TAS [1]	
MIGS-15	Biotic relationship	Commensalism	IDA	
MIGS-14	Pathogenicity	Non-pathogenic		
MIGS-4	Geographic location	France		
MIGS-5	Sample collection	January 14, 2009		
MIGS-4.1	Latitude	Not reported		
MIGS-4.2	Longitude	Not reported		
MIGS-4.4	Altitude	Not reported		

<sup>a</sup>Evidence codes – IDA Inferred from Direct Assay; TAS Traceable Author Statement (i.e., a direct report exists in the literature); NAS Non-traceable Author Statement (i.e., not directly observed for the living, isolated sample, but based on a generally accepted property for the species, or anecdotal evidence). These evidence codes are from the Gene Ontology project [68]



from 37 to 42  $^{\circ}\text{C}$  and within a pH range of 5.5–8.0 (the best growth occurs at pH 7) [1] (Table 1). Like typical members of the *E. coli* species, the commensal strain BG1 utilizes D-glucose, D-mannitol, L-rhamnose, D-saccharose, D-melibiose and L-arabinose. Unlike most pathogenic O157:H7 EHEC strains, the strain BG1 is able to use sorbitol as a carbon source. In addition, *E. coli* BG1 is positive for arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase,  $\beta$ -galactosidase and indole production.

In silico serotyping using SerotypeFinder (version 1.1) [12] revealed that *E. coli* BG1 belongs to the serotype O159:H21. The whole genome of *E. coli* BG1 lacked all the genes encoding antimicrobial resistance screened using ResFinder (version 2.1) [13]. *E. coli* strains can be divided into different phylogroups (A, B1, B2, D and E) commonly used to investigate the evolution and diversity of *E. coli* strains [14]. Phylogrouping was performed in silico using the quadruplex method described by Clermont et al. [14] and the primersearch program from the EMBOSS open software suite [15]. *E. coli* BG1 belongs to the phylogroup B1, which is commonly distributed among both bovine commensal and human pathogenic *E. coli* strains [16, 17].

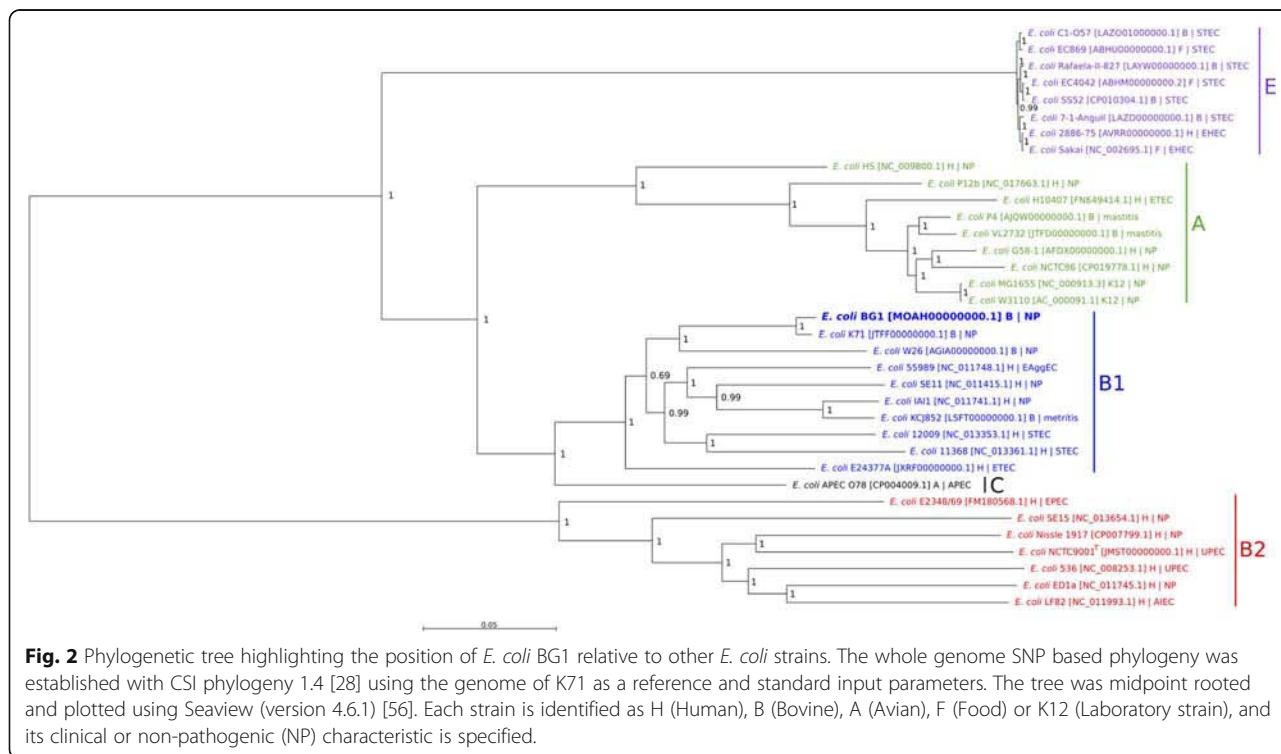
A whole genome phylogenetic analysis based on single nucleotide polymorphism (SNP) differences in *E. coli*

BG1, bovine and human commensal *E. coli* strains, bovine pathogenic *E. coli* strains and bovine O157:H7 STEC strains (Additional file 1: Table S1) was conducted using CSI Phylogeny (version 1.4) [18]. Published *E. coli* genomes representing different *E. coli* pathotypes were selected for genomic comparison (Additional file 1: Table S1). In addition, two reference *E. coli* strains, one of which is the *E. coli* type strain (NCTC9001<sup>T</sup>), were also included in this study. As shown in Fig. 2, the bacterial strains were clustered according to the phylogroup classification: BG1 was clustered with commensal and pathogenic *E. coli* strains belonging to phylogroup B1 (EHEC, STEC, ETEC, EAEC, APEC and *E. coli* responsible for postpartum metritis in dairy cows). The closest relative strains to BG1 were *E. coli* K71 isolated from the environment of a cow shed and *E. coli* W26 isolated from bovine feces, both of which belong to the phylogroup B1 (Fig. 2). In contrast, BG1 was more distantly clustered to pathogenic bovine and human *E. coli* strains (Fig. 2). However, *E. coli* KCJ852 (phylogroup B1), which is responsible for metritis, was more closely clustered to BG1 than the P4 and VL2732 strains associated with bovine mastitis (phylogroup A) (Fig. 2). It is of interest to note that i) the bovine *E. coli* strains of commensal origin (BG1, K71 and W26) were distantly related to bovine STEC O157:H7 strains (phylogroup E) and ii) the SNP-based phylogeny analysis failed to cluster the commensal *E. coli* strains according to their human or animal origin.

## Genome sequencing information

### Genome project history

Bovine commensal *E. coli* strains are poorly documented. Therefore, the *E. coli* BG1 strain was selected for genome sequencing to provide valuable genetic information for future genomic scale (whole genome) comparative analysis. *E. coli* BG1 has been used as a reference strain in studies related to carbon and nitrogen nutrition of *E. coli* strains in the bovine gastro-intestinal tract [10, 11]. The strain BG1 was isolated from the small intestine content of a cow at the slaughterhouse in January 2009. The animal was raised and slaughtered in accordance with the guidelines of the local ethics committee and current INRA (National Institute for Agricultural Research) ethical guidelines for animal welfare (Slaughterhouse Permit number: 63,345,001). The bovine intestinal samples were collected after the slaughter of animals required for experiments specifically approved by the “Comité d’éthique en matière d’expérimentation animale en Auvergne” (Permit number: CE22-08) in the experimental slaughterhouse of the “Herbipole”, INRA Saint-Genès-Champanelle, France. The Whole Genome Shotgun project was deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession MOAH00000000 (Oct 31, 2016). A summary of the sequencing project information is provided in Table 2.



**Growth conditions and genomic DNA preparation**

*E. coli* BG1 was inoculated in Luria-Bertani broth from a single colony and incubated at 37 °C with shaking (200 rpm) to early stationary phase. The bacterial suspension was then centrifuged (10,000 g for 15 min) and the total DNA was extracted from the bacterial pellet using the DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer’s recommendations (Qiagen). DNA was

quantified using a Nanodrop spectrophotometer and DNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining.

**Table 2** Genome sequencing project information for *E. coli* BG1

MIGS ID	Property	Term
MIGS 31	Finishing quality	High quality draft
MIGS-28	Libraries used	Paired ends library
MIGS 29	Sequencing platforms	Illumina MiSeq
MIGS 31.2	Fold coverage	127x
MIGS 30	Assemblers	SPAdes version 3.1.1
MIGS 32	Gene calling method	PROKKA version 1.10
	Locus Tag	BLX34
	Genbank ID	MOAH00000000
	GenBank Date of Release	2017-02-24
	GOLD ID	
	BIOPROJECT	PRJNA351833
MIGS 13	Source Material Identifier	BG1
	Project relevance	Commensal <i>E. coli</i> (control strain)

**Genome sequencing and assembly**

Whole genome sequencing was performed at the GeT-PlaGe core facility (INRA Toulouse, France). DNA-seq libraries were prepared according to Illumina’s protocols using the Illumina TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit. Briefly, DNA was fragmented by sonication using a Covaris M220 and adapters were ligated to be sequenced. Eight cycles of PCR were applied to amplify libraries. Library quality was assessed using the Agilent Bioanalyzer and libraries were quantified by qPCR using the Kapa Library Quantification Kit. DNA-seq experiments were performed on an Illumina MiSeq using a paired-end read length of 2 × 250 bp with the Illumina MiSeq Reagent Kits v2. The raw reads were stored in ng6 [19] and quality was checked using fastqc [20]. They were assembled with SPAdes (version 3.1.1) [21] using standard parameters.

**Genome annotation**

The assembled contigs were annotated with Prokka (version 1.10) [22] using standard parameters. Predicted genes were also assigned to functional categories of Clusters of Orthologous Groups (COGs) of proteins

using blastp against the NCBI COG 2014 database [23]. Additional gene features were predicted using TMHMM Server 2.0 [24], SignalP Server (version 4.1) [25], CRISPRfinder (last update 2016–09-01) [26] and ISSaga (version 2.0) [27]. PHASTER [28] was then used to identify prophage regions in the BG1 genome. A prophage region was considered to be intact if the associated completeness score was above 90, questionable if the score was between 70 and 90 and incomplete if the score was less than 70 [28].

### Genome properties

The genome of *E. coli* BG1 consists of 4,782,107 bp with no discernible plasmid (no match retrieved with PlasmidFinder version 1.3 [29]), and a G + C content of 50.7%. The genome has been assembled into 84 contigs. Of the 4562 predicted genes, 4465 coded for protein and 97 were RNA-related (including eight 5S rRNA genes, suggesting the presence of 8 rRNA operons, and 86 tRNA genes). In addition, 22 pseudo genes were identified. Among the 4465 protein coding genes, 3831 (85.8%) had an assigned function while the 634 remaining genes (14.2%) encoded proteins annotated as hypothetical or unknown. In addition, the BG1 genome contained 38 predicted insertion sequences (ISs), 4 intact and 1 questionable prophage regions, and 2 CRISPR elements suggesting possible genetic crosstalk, such as horizontal gene transfer among the *E. coli* population. The genome properties are presented in Table 3. The distribution of genes into COGs functional categories is summarized in Table 4.

**Table 3** Genome statistics

Attribute	Value	% of Total <sup>a</sup>
Genome size (bp)	4,782,107	100.00
DNA coding (bp)	4,218,785	88.22
DNA G + C (bp)	2,424,397	50.70
DNA scaffolds	84	
Total genes	4562	100.00
Protein coding genes	4465	97.88
RNA genes	97	2.13
Pseudo genes	22	0.48
Genes in internal clusters	1171	25.67
Genes with function prediction	3831	83.98
Genes assigned to COGs	3814	83.60
Genes with Pfam domains	275	6.03
Genes with signal peptides	174	3.81
Genes with transmembrane helices	1080	23.67
CRISPR repeats	2	

<sup>a</sup>The total is based on either the size of the genome in base pairs or the total number of proteins coding genes in the annotated genome. All the information has been obtained from Prokka annotation

**Table 4** Number of genes associated with general COGs functional categories

Code	Value	% age <sup>a</sup>	Description
J	250	6.55	Translation, ribosomal structure and biogenesis
A	2	0.05	RNA processing and modification
K	293	7.68	Transcription
L	154	4.04	Replication, recombination and repair
B	0	0.00	Chromatin structure and dynamics
D	41	1.07	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
V	93	2.44	Defense mechanisms
T	176	4.61	Signal transduction mechanisms
M	271	7.11	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
N	156	4.09	Cell motility
U	60	1.57	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
O	153	4.01	Post-translational modifications, protein turnover, chaperones
C	282	7.39	Energy production and conversion
G	381	9.99	Carbohydrate transport and metabolism
E	335	8.78	Amino acid transport and metabolism
F	101	2.65	Nucleotide transport and metabolism
H	169	4.43	Coenzyme transport and metabolism
I	119	3.12	Lipid transport and metabolism
P	190	4.98	Inorganic ion transport and metabolism
Q	53	1.39	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	211	5.53	General function prediction only
S	238	6.24	Function unknown
–	750	7.43	Not in COGs

<sup>a</sup>The total is based on the total number of proteins coding genes in the annotated genome

### Extended insights

#### Genome repertoire comparison

It is admitted that bacterial genome sequences show significant diversity due to horizontal gene transfers, gene loss and other genomic rearrangements [1]. In this report, characteristics of whole genome datasets of a selection of *E. coli* strains were compared with those of *E. coli* BG1 (Table 5). Our main objective was to compare the genome of BG1 with that of bovine (K71 and W26) and human (SE15 and Nissle) commensal *E. coli* strains, but we also included a bovine pathogenic strain (VL2732) and a human EHEC pathogen (Sakai), as the bovine intestine is the main reservoir of EHEC [10]. A human uropathogenic strain (NCTC9001<sup>T</sup>), which is also the *E. coli* type strain, was also included as reference. These strains were assigned to different phylogroups (Additional file 1: Table S1; Fig. 2). As expected, the

**Table 5** Characteristics of whole genome datasets of different *E. coli* strains

Strain name	Phylo group	Origin <sup>a</sup>	Plasmid(s)	Genome size (bp) [chromosome + plasmid(s)]	G + C ratio (%)	CDS (nb)	Protein coding regions (nb)	rRNA operons (nb) <sup>b</sup>	tRNA genes (nb)
BG1	B1	Bc	0	4,782,107	50.7	4562	4465	8	86
K71	B1	Bc	0	5,115,070	50.7	5178	4872	4	65
W26	B1	Bc	0	5,118,532	50.6	4925	4852	4	66
Nissle 1917	B2	Hc	0	5,441,200	50.6	5417	4970	10	121
SE15	B2	Hc	1	4,839,683 [4,717,338 + 122,345]	50.7	4763	4572	7	85
NCTC86	A	Hc	0	5,111,920	50.6	5243	4934	7	87
VL2732	A	Bp	0	4,664,032	50.6	4615	4363	4	71
Sakai	E	Hp	2	5,594,477 [5,498,450 + 92,721 + 3306]	50.5	5447	5324	7	103
NCTC9001 <sup>T</sup>	B2	Hp	0	5,038,133	50.6	5154	4859	6	62

<sup>a</sup>B: bovine; H: human; c: commensal; p: pathogen

<sup>b</sup>Minimal number of rRNA operons based on Prokka (BG1) or Genbank (K71, W26, VL2732, NCTC86, NCTC9001<sup>T</sup>) annotation or on *rrnDB* (version 5.1) information [69]

greatest difference in genome size was observed between BG1 and the EHEC strain Sakai (the genome size of BG1 is 812,370 bp smaller than the Sakai genome [17.0% of the BG1 genome]). This difference could be explained by the number of mobile genetic elements: the Sakai genome contains 18 prophage regions (at most 5 in the BG1 genome) and 80 insertion sequences (38 in the BG1 genome) [30]. About half of the Sakai-specific sequences are of bacteriophage origin and carry the genes involved in EHEC pathogenesis (bloody diarrhea, hemolytic uremic syndrome) [30]. More surprisingly, the chromosome length of the commensal *E. coli* Nissle 1917 is 659,093 bp larger than the BG1 genome (13.8% of the BG1 genome). *E. coli* Nissle 1917 is a human commensal strain known to be a successful colonizer of the human gut and used as a probiotic for the treatment of various intestinal disorders [31]. It is well documented that the Nissle genome carries at least three genomic islands (GEIs) inserted at different tRNA sites (*serX*, *argW* and *pheV*) probably acquired by horizontal gene transfer [32, 33]. These GEIs contained genes encoding proteins considered as fitness factors (microcins, iron uptake systems, proteases ...) contributing to survival of *E. coli* Nissle and successful colonization of the human body [32, 33]. These GEIs were found in non-pathogenic *E. coli* strains but were also frequently distributed among ExPEC strains [32]. Sequence comparison showed that the genes carried by Nissle 1917 GEIs (*mch*, *mcm*, *iro*, *iuc*, *sat*, *iha*, *ybt*) are absent in the BG1 genome, suggesting the absence of these GEIs in BG1.

In accordance with the differences in genome size, the highest number of tRNA genes, described as common sites for integration of foreign DNA elements (bacteriophages, genomic islands), were detected in the genome

of *E. coli* strains Nissle and Sakai (121 and 103 tRNA genes, respectively while only 86 were identified in the BG1 draft genome (Table 5). The genome of the remaining strains carried 62 (in the type strain NCTC 9001<sup>T</sup>) to 85 tRNA-encoding genes (Table 5). These numbers may be slightly different depending on the annotation pipeline used for the draft genome sequences.

#### Virulence factors

The genes encoding virulence factors in the *E. coli* BG1 genome were analyzed using *blastn* against the Virulence Factors Database genomic dataset [34]. A total of 164 genes encoding virulence factors were identified in BG1 (Additional file 2: Table S2), while 181 and 202 genes encoding virulence factors were found in the reference strains NCTC86 and NCTC9001<sup>T</sup>, respectively. In-depth analysis of the BG1 genome showed that most of these genes are involved in bacterial adherence to the host epithelium, iron acquisition systems (siderophores) and flagella synthesis. As expected, genes coding for toxins produced by pathogenic *E. coli* strains responsible for diarrhea or intestinal damage in mammals (Shiga-toxin, heat stable [ST] toxin, heat-labile [LT] toxin, heat-stable enterotoxin 1 [EAST1], cytotoxic necrotizing factor 1 [CNF1]) are absent in the BG1 genome. The *E. coli* BG1 genome also lacks the genes encoding  $\alpha$ -hemolysin and enterohemolysin which are involved in the virulence of pathogenic *E. coli* strains.

#### Adherence systems

A total of 49 genes coded for the synthesis of organelles involved in adherence of *E. coli* to host intestinal epithelium (Additional file 3: Table S3). Accordingly, the transmission electron micrograph of *E. coli* BG1 showed numerous fimbriae surrounding the bacteria (Fig. 1). Removal of partial genes and incomplete gene clusters

**Table 6** Adherence systems encoded by the *E. coli* BG1 genome

Adherence system	Gene or genes cluster	Pathotype <sup>a</sup>	in vitro cell adherence <sup>b</sup>	Receptor
Curli fimbriae	<i>csgDEFG, csgBA</i>	EHEC, ETEC, aEPEC, APEC	T84	Matrix, plasma proteins
EhaA autotransporter	<i>ehaA</i>	EHEC, EAEC, ETEC, AIEC, EPEC	Primary bovine epithelial cells (terminal rectum)	Unknown
EhaB autotransporter	<i>ehaB</i>	EHEC, UPEC, ETEC, EIEC, EAEC	NA <sup>c</sup>	Collagen I, laminin
EhaC autotransporter	<i>ehaC (yfaL)</i>	EHEC, UPEC	Unknown	Unknown
ECP ( <i>E. coli</i> Common Pilus)	<i>ecpRABCDE</i>	ETEC, EHEC, NMEC, EAEC, aEPEC, septicemia	HT29, Hep-2, HeLa, HTB-4	Arabinosyl residues
ELF ( <i>E. coli</i> Laminin-binding Fimbriae)	<i>ycbQRST</i>	EHEC, aEPEC	HT29, Hep-2, MDBK	Laminin
F9 Fimbriae	<i>z2200-z2206</i>	EHEC, UPEC, APEC, AIEC, EAEC, EPEC	EBL	Bovine fibronectin, Gal $\beta$ 1-3GlcNAc
EaeH adhesin	<i>eaeH</i>	UPEC, EHEC, ETEC, NMEC	UM-UC-3, Caco-2, CHO, HeLa, Vero	Unknown
HCP (Hemorrhagic Coli Pilus)	<i>hcpABC (ppdD-hofBC)</i>	ETEC, EHEC, aEPEC, APEC	T84, Caco-2, HeLa, Hep-2, MDBK, cow colon explants	Laminin, fibronectin
Stg fimbriae	<i>stgABCD</i>	APEC, UPEC	UM-UC-3, INT 407	Unknown
T1P (Type I pili)	<i>fimBE, fimAICDFGH</i>	UPEC, aEPEC, EAEC, APEC, STEC	HeLa, REC, colonic and ileal enterocytes	Mannose
UpaG autotransporter	<i>upaG</i>	UPEC	T24	Fibronectin, laminin

<sup>a</sup>See the "Abbreviations" paragraph

<sup>b</sup>Cell lines: T84 (human colonic adenocarcinoma), HT29 (human colorectal adenocarcinoma), Hep-2 (epithelial cells from epidermoid carcinoma of the human larynx), HeLa (human cervix epithelial carcinoma), HTB-4 (human bladder transitional carcinoma), MDBK (Madin-Darby bovine kidney), EBL (embryonic bovine lung), UM-UC-3 (human bladder carcinoma), Caco-2 (human colon carcinoma), CHO (Chinese hamster ovary), Vero (kidney epithelial cells from an African green monkey), INT 407 (HeLa derivative), REC (human B cell lymphoma), T24 (human bladder transitional carcinoma)

<sup>c</sup>NA: no adherence to the cells lines tested

revealed that BG1 possessed the genetic information required to encode 12 potentially functional full adherence systems (Table 6). All these systems are known to be produced by pathogenic *E. coli* and to adhere in vitro to different cells lines (Table 6) (for reviews see [35–37]). These adherence systems reflect the ability of commensal *E. coli* to colonize distinct niches during its transit through the different compartments of the bovine gastro-intestinal tract. It is also of interest to note that some of these adherence systems possess characteristics corresponding to physiological conditions encountered in the bovine gastro-intestinal tract: i) *eaeH* expression is induced at 39 °C, the internal bovine temperature, but not at 37 °C [38] ii) the pili HCP is involved in adherence of *E. coli* to bovine gut explants [39] and iii) the F9 fimbriae are essential for in vivo colonization of calves [40]. Furthermore, the *stg* and *F9* gene clusters are strongly associated with *E. coli* belonging to phylogenetic group B1 [41, 42]. To broaden these results, in silico analysis of adherence systems carried by additional *E. coli* strains (human and bovine commensal and pathogenic isolates) (Additional file 1: Table S1; Additional file 4: Figure S1) was also performed. A hierarchical clustering based on the presence/absence of 78 distinct adherence systems encoding genes was built using R (version 3.3.1) [43]. As shown in Additional file 4: Figure S1, bovine

and human *E. coli* strains were not separately distributed (the closest relative strains to BG1 were the human *E. coli* strains S11 and IA11 [Additional file 4: Figure S1]) suggesting that the adherence systems are associated with the adaptation of *E. coli* to a specific habitat (i.e. the digestive tract) rather than host specificity. As expected, the uropathogenic strain NCTC9001<sup>T</sup> possesses the *pap* ACDE-GHIK genes which are specific to UPEC strains [44].

Some of these adherence systems possess redundant properties: EhaB, ELF, HCP and UpaG are known to bind to laminin and curli, EhaA, EhaB, EhaC, ECP, F9, EaeH, HCP and UpaG are involved in biofilm formation (Table 6). This suggested an important role of both laminin binding and biofilm formation in survival and/or multiplication of commensal *E. coli*. Laminin is an extracellular matrix commonly present in the mammalian intestine which act as an interlinking molecule in connective tissues that promote bacterial adhesion and colonization to the host tissues [45]. Moreover, commensal *E. coli* strains can reside in mixed biofilms in the mucus layer covering the mouse intestine [4, 46]. Because the survival of *E. coli* depends on anaerobes that degrade polysaccharides included in the mucus layer, it has been hypothesized that the anaerobes in the mixed biofilms provide *E.*

*coli* with monosaccharide locally rather than from a mixed pool available to all species [4, 46]. Therefore, the mixed biofilm formation can result in a more efficient carbon source for commensal *E. coli* strains in the mammalian gut [4, 46].

As discussed above, the adhesion systems encoded by the BG1 genome were associated with *E. coli* strains mostly isolated from clinical cases (Table 6). However, it is important to note that the BG1 genome did not carry the genes encoding the F17, F5 and F41 fimbriae and the afimbrial adhesin CS31A mainly associated with bovine pathogenic *E. coli* strains involved in diarrhea [47]. For example, a recent epidemiological study showed that the F5/F41 fimbriae were prevalent among bovine diarrheagenic *E. coli* isolated in France [48]. The genes encoding F17, F5 and F41 are not detected in the genome of the human and bovine *E. coli* strains included in this study suggesting that these adherence systems are specific to bovine intestinal pathogenic *E. coli*.

#### **Flagella synthesis**

A total of 47 genes encoding proteins required for flagella synthesis were present in the BG1 genome. Accordingly, the transmission electron micrograph of *E. coli* BG1 showed peritrichous flagella attached to the bacterial cell surface and clearly distinct from fimbriae (Fig. 1). Flagella are mainly locomotive organelles allowing bacterial movements. However, it is well documented that the flagella (also known as H-antigen) of some pathogenic *E. coli* mediate the adhesion to or invasion of epithelial cells (NMEC, aEPEC, ETEC, EAEC, EHEC, APEC) and contribute to biofilm formation (UPEC, ETEC) (for a review see Zhou et al. [49]). In particular, flagella of aEPEC, ETEC and EHEC strains specifically recognized a receptor located at the microvillus tips of human enterocytes [50]. Interestingly, *E. coli* BG1 possesses the genetic information required to encode the flagella H21, a H antigen type reported to be involved in the invasion of EHEC O113:H21 into HCT-8 colonic epithelial cells [49]. Also, it should be noted that STEC strains with serotype O159:H21 have been isolated from bovine as well as porcine feces [51, 52].

#### **Iron acquisition systems**

Complete genetic information required for enterobactin synthesis (*entABCDEFGHI*) and ferric-enterobactin uptake (*fepABCDEFGHI*) was present in the genome of *E. coli* BG1 (Additional file 2: Table S2). Siderophores, including enterobactin, are mechanisms secreted by *E. coli* to scavenge iron in order to survive and multiply in hosts or external environments. Siderophores are usually described as crucial for the proliferation of pathogenic *E. coli* in the host and have been classified as virulence

factors. However, enterobactin is frequently produced by commensal *E. coli* isolated from healthy mammals (human and animal isolates) [53]. *ent* and *fep* genes were also found in the genome of the reference strain NCTC86 (data not shown). Accordingly, Pi et al. have demonstrated that enterobactin plays a fundamental role in the colonization of healthy mouse gastro-intestinal tract by non-pathogenic *E. coli* [54].

#### **Ethanolamine utilization**

In a previous study, we demonstrated that ethanolamine present in the bovine gut is used by EHEC as a nitrogen source [11]. Furthermore, ethanolamine promotes expression of fimbrial genes and influenced EHEC adherence to epithelial cells [55]. Interestingly, *E. coli* BG1 is unable to degrade ethanolamine present in the bovine intestine, while the EHEC reference strain EDL933 gains a growth competitive advantage by assimilating ethanolamine in bovine intestinal content [11]. Therefore, we performed in-depth analysis of the genes involved in ethanolamine utilization in order to understand the inability of the commensal strain BG1 to use ethanolamine as a nitrogen source.

The degradation and assimilation of ethanolamine by EHEC EDL933 requires exogenous adenosylcobalamin (Ado-Cbl) and are encoded by 17 genes included in the *eut* operon [11]. In this study, we used blastn and SeaView (version 4.6.1) [56] to compare the *eut* genes of *E. coli* BG1 with those of EHEC EDL933. Sequence alignment showed 317 SNPs between the two *eut* operons (97.82% identity) (Additional file 5: Table S4). In addition, no premature stop codon was detected and only 34 amino acid changes due to non-synonymous SNPs were identified among the 17 predicted polypeptides encoded by the *eut* operon of BG1 (Additional file 5: Table S4). Furthermore, the presence of a 72 bp insertion was also identified in the *eutT* gene coding for cobalamin adenosyltransferase in the BG1 genome compared with the EDL933 genome (Additional file 6: Figure S2). It is important to note that ethanolamine ammonia-lyase, the key enzyme in ethanolamine degradation, required the Ado-Cbl cofactor produced by EutT to be active. The 72 bp insertion sequence at position 395 resulted in a modified translated polypeptide with 24 additional amino acids at position 132. The possible EutT conformation illustrated in Fig. 3 was predicted using Phyre (version 2.0) [57] and showed that 18 of the 24 amino acids encoded by the 72 bp sequence were predicted to form an additional alpha helix in the BG1 EutT protein.

In summary, in view of the 34 amino acid changes due to non-synonymous SNPs among the 17 predicted polypeptides encoded by the *eut* operon and the prediction





**Fig. 3** Predicted secondary structure modeling of the EutT protein of *E. coli* BG1 obtained with Phyre version 2.0 [57]

of an additional alpha helix in BG1 EutT cobalamin adenosyltransferase, we suspected a reduced or abolished ethanolamine ammoniolyase activity, which could explain the inability of BG1 to assimilate ethanolamine in the bovine digestive tract.

### Conclusion

The comparison of whole genomes provides information on gene content and organization, and gives an overview of how organisms are related. The draft genome sequence of *E. coli* BG1 isolated from the bovine intestine is now available and can provide valuable information at the genomic scale to explore the genetic and functional features adapted to the bovine gut. The genome of *E. coli* BG1 can be used as a reference for subsequent evolution and comparative studies (some examples of genome comparative analysis have already been described in this report).

As expected, the BG1 genome does not carry the genetic information encoding toxins responsible for

intestinal damage. More surprisingly, the *E. coli* BG1 strain possesses the genetic information required to encode systems classified as “virulence factors” and produced by pathogenic *E. coli*. This could suggest that genes encoding virulence factors are “in transit” from commensal species that act as genetic depositories with the ability to transmit DNA fragments to pathogenic *E. coli* strains. However, both pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains are able to colonize the gut and seem to use similar factors to adhere to the host epithelial cells. Therefore, it is questionable whether the ability of intestinal *E. coli* to colonize the host gut (resistance to the intestinal flux), excrete siderophores (iron uptake from the surrounding environment) and produce flagella (capacity to move toward nutrient-rich environments) can be considered as “virulence factors”. The terms “virulence”, “fitness” and “colonization” factors appear to overlap for *E. coli* species. In fact, factors contributing to *E. coli* survival in a given environment should be considered as fitness and adaptation factors

enabling successful colonization of the host rather than strict markers of pathogenesis. In contrast, the factors responsible for disease establishment or intestinal damages during infection (e.g. aqueous or hemorrhagic diarrhea), such as toxins or the type III secretion system, appear to be true virulence factors.

## Additional files

**Additional file 1: Table S1.** *E. coli* strains included in this study (XLSX 13 kb)

**Additional file 2: Table S2.** Genes encoding virulence factors in the *E. coli* BG1 genome (XLSX 31 kb)

**Additional file 3: Table S3.** Genes encoding adherence systems in *E. coli* BG1 genome (XLSX 11 kb)

**Additional file 4: Figure S1.** Hierarchical clustering of *E. coli* strains according to adherence systems encoding genes. The dendrogram and associated heatmap are generated on the basis of gene presence/absence considering 78 genes involved in adherence, using binary distance and complete clustering method, R version 3.3.1. [43]. Blue color indicates gene presence, red gene absence. The origin of each strain is identified with B (Bovine) or H (Human). The color of the strain name corresponds to its phylogroup as in Fig. 2. (DOCX 67 kb)

**Additional file 5: Table S4.** Genes encoding the transport and assimilation of ethanolamine in *E. coli* BG1 genome. (XLSX 12 kb)

**Additional file 6: Figure S2.** Nucleotide sequence alignment of the *eutT* gene. The sequences of the *eutT* gene and the translated EutT polypeptide were aligned respectively from *E. coli* strains BG1 and EDL933 using Seaview version 4.6.1 [56]. (DOCX 15 kb)

## Abbreviations

AIEC: Adherent-invasive *E. coli*; APEC: Avian pathogenic *E. coli*; EAaggEC: Enteraggregative *E. coli*; EHEC: Enterohemorrhagic *E. coli*; EPEC: Enteropathogenic *E. coli*; ETEC: Enterotoxigenic *E. coli*; ExPEC: Extraintestinal pathogenic *E. coli*; NMEC: Neonatal meningitis *E. coli*; STEC: Shiga-producing *E. coli*; UPEC: Uropathogenic *E. coli*

## Acknowledgements

The authors thank Frédérique Chaucheyras-Durand for critical reading of the manuscript, Alexandra Durand and Marine Bertoni for excellent technical assistance, Brigitte Gaillard-Martinie for the transmission electron microscopy and Olivier Bouchez for genome sequencing. The genome sequencing was performed at the GeT core facility, Toulouse, France (<http://get.genotoul.fr>), and was supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of the "Investissement d'avenir" program managed by the Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). We are also grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrénées (Genotoul Bioinfo) for providing computing and storage resources.

## Authors' contributions

EF and YB designed and coordinated the study; PA and CK performed the bioinformatic analysis; CK performed the genome assembly and annotation; AS performed the laboratory experiments; EF, YB, PA, AS and CK wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>Plateforme Bioinformatique Toulouse, Midi-Pyrénées UBIA, INRA, Auzeville Castanet-Tolosan, France.

Received: 7 March 2017 Accepted: 21 September 2017

Published online: 10 October 2017

## References

- Welch RA. The genus *Escherichia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*, vol. 6. Third ed. Berlin: Springer; 2006. p. 60–71.
- Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *elife*. 2015;4:e05826.
- Jones SA, Gibson T, Maltby RC, Chowdhury FZ, Stewart V, Cohen PS, Conway T. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun*. 2011;79:4218–26.
- Conway T, Cohen PS. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiol Spectr*. 2015; doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:123–40.
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*. 2010;140:360–70.
- Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park SH, Ooka T, Iyoda S, Taylor TD, Hayashi T, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res*. 2008;15:375–86.
- Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 2008;190:6881–93.
- Toh H, Oshima K, Toyoda A, Ogura Y, Ooka T, Sasamoto H, Park SH, Iyoda S, Kurokawa K, Morita H, et al. Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. *J Bacteriol*. 2010;192:1165–6.
- Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, Cohen PS, Conway T, Forano E, Martin C. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol*. 2013;15:610–22.
- Bertin Y, Girardeau JP, Chaucheyras-Durand F, Lyan B, Pujos-Guillot E, Harel J, Martin C. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ Microbiol*. 2011;13:365–77.
- Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2410–26.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2640–4.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5:58–65.
- Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000;16:276–7.
- Askari Badouei M, Jajarmi M, Mirsalehian A. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015;38:15–20.
- Bok E, Mazurek J, Stosik M, Wojciech M, Baldy-Chudzick K. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12:970–85.
- Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One*. 2014;9:e104984.
- Mariette J, Escudie F, Allias N, Salin G, Noirot C, Thomas S, Klopp C. NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics*. 2012;13:462.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 10 Oct 2016.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pjibelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19:455–77.

22. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30:2068–9.
23. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Bryant SH. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D492–6.
24. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001;305:567–80.
25. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8:785–6.
26. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W52–7.
27. Varani AM, Siguier P, Gourbeyre E, Charneau V, Chandler M. ISSaga is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. *Genome Biol*. 2011;12:R30.
28. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W16–21.
29. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Moller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:3895–903.
30. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res*. 2001;8:11–22.
31. Lodinova-Zadnikova R, Sonnenborn U. Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate*. 1997;71:224–32.
32. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2004;186:5432–41.
33. Sun J, Gunzer F, Westendorf AM, Buer J, Scharfe M, Jarek M, Gossling F, Blocker H, Zeng AP. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotechnol*. 2005;117:147–61.
34. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:D325–8.
35. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog*. 2009;1:22.
36. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:822–80.
37. McWilliams BD, Torres AG. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectrum*. 2014; doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013.
38. Easton DM, Allsopp LP, Phan MD, Moriel DG, Goh GK, Beatson SA, Mahony TJ, Cobbold RN, Schembri MA. The intimin-like protein FdeC is regulated by H-NS and temperature in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:7337–47.
39. Xicotencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, Puente JL, Giron JA. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest*. 2007;117:3519–29.
40. Dziva F, van Diemen PM, Stevens MP, Smith AJ, Wallis TS. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*. 2004;150:3631–45.
41. Lymberopoulos MH, Houle S, Daigle F, Leveille S, Bree A, Moulin-Schouleur M, Johnson JR, Dozois CM. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol*. 2006;188:6449–59.
42. Wurpel DJ, Totsika M, Allsopp LP, Hartley-Tassell LE, Day CJ, Peters KM, Sarkar S, Ulett GC, Yang J, Tiralongo J, et al. F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* are expressed at low temperature and recognise Galbeta1-3GlcNAc-containing glycans. *PLoS One*. 2014;9:e93177.
43. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: The R Project for Statistical Computing; 2016.
44. Arthur M, Campanelli C, Arbeit RD, Kim C, Steinbach S, Johnson CE, Rubin RH, Goldstein R. Structure and copy number of gene clusters related to the *pap P*-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1989;57:314–21.
45. Simon-Assmann P, Spenle C, Lefebvre O, Keding M. The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;96:175–206.
46. Leatham-Jensen MP, Frimodt-Moller J, Adediran J, Mokszycki ME, Banner ME, Caughron JE, Krogfelt KA, Conway T, Cohen PS. The streptomycin-treated mouse intestine selects *Escherichia coli envZ* missense mutants that interact with dense and diverse intestinal microbiota. *Infect Immun*. 2012;80:1716–27.
47. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*. 2005;295:443–54.
48. Valat C, Forest K, Auvray F, Metayer V, Meheut T, Polizzi C, Gay E, Haenni M, Oswald E, Madec JY. Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:7230–4.
49. Zhou M, Yang Y, Chen P, Hu H, Hardwidge PR, Zhu G. More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99:8883–90.
50. Sampaio SC, Luiz WB, Vieira MA, Ferreira RC, Garcia BG, Sinigaglia-Coimbra R, Sampaio JL, Ferreira LC, Gomes TA. Flagellar cap protein FliD mediates adherence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to enterocyte microvilli. *Infect Immun*. 2016;84:1112–22.
51. Baranzoni GM, Fratamico PM, Gangirella J, Patel I, Bagi LK, Delannoy S, Fach P, Boccia F, Anastasio A, Pepe T. Characterization of shiga toxin subtypes and virulence genes in porcine shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2016;7:574.
52. Pigatto CP, Schocken-Iturrino RP, Souza EM, Pedrosa FO, Comarella L, Irino K, Kato MA, Farah SM, Warth JF, Fadel-Picheth CM. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Parana State. *Brazil Can J Microbiol*. 2008;54:588–93.
53. Searle LJ, Meric G, Porcelli I, Sheppard SK, Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2015;10:e0117906.
54. Pi H, Jones SA, Mercer LE, Meador JP, Caughron JE, Jordan L, Newton SM, Conway T, Klebba PE. Role of catecholate siderophores in gram-negative bacterial colonization of the mouse gut. *PLoS One*. 2012;7:e50020.
55. Garsin DA. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:290–5.
56. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. 2010;27:221–4.
57. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015;10:845–58.
58. Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, Tatusova T, Thomson N, Allen MJ, Angiuoli SV, et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol*. 2008;26:541–7.
59. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4576–9.
60. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Phylum XIV. Proteobacteria *phyl. nov.* In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition, Volume 2, Part B*. New York: Springer; 2005. p. 1.
61. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Class III. Gammaproteobacteria *class. nov.* In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition, Volume 2, Part B*. New York: Springer; 2005. p. 1.
62. Euzéby J. Validation list no. 106. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:2235–8.
63. Garrity GM, Holt JG. Taxonomic outline of the archaea and bacteria. In: Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Second ed. New York: Springer; 2001. p. 155–66.
64. Hill LR, Skerman VBD, Sneath PHA. Corrigenda to the approved lists of bacterial names: edited for the international committee on systematic bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*. 1984;34:508–11.
65. Rahn O. New principles for the classification of bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1937;96:273–86.
66. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*. 1980;225–420.
67. Castellani A, Chalmers AJ. Genus *Escherichia* Castellani and Chalmers, 1918. Wood W. And Co. *Manual of Tropical Medicine*. Third edition. New York; William Wood and Company; 1919. p.941-3.

68. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25:25–9.
69. Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BR, Schmidt TM. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D593–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## II.5. Conclusion

En conclusion de ce chapitre, nous avons montré que la souche *E. coli* O157:H7 MC2 était bien adaptée à la survie dans le tube digestif du bovin de manière similaire à la souche clinique EDL933 et à la souche *E. coli* commensale bovine BG1. Ces souches possèdent en effet de nombreux systèmes d'adhésion qui leur permettraient de coloniser efficacement l'épithélium intestinal. De plus, ces trois souches sont capables de survivre de longues périodes dans les fèces bovines à une température de 15°C, suggérant qu'elles sont capables de résister aux conditions à priori défavorables de l'environnement. Cependant, ces souches semblent mettre en place des mécanismes de résistance aux stress différents. Une étude approfondie des systèmes de résistance aux stress rencontrés dans l'environnement permettrait de mieux comprendre le caractère de persistance de souches d'origine bovine et humaine qui semble différent. Nous avons en particulier montré que certains systèmes toxine/anti-toxine (TA) pouvaient contribuer à la survie de la souche MC2 dans les fèces ; nous avons montré au chapitre précédent, que ces systèmes semblaient également impliqués dans la survie de la souche EDL933 au niveau du rumen. Il serait alors intéressant d'analyser de manière approfondie la contribution des différents systèmes TA à la survie des EHEC dans et hors le tube digestif de l'animal. Bien que les fèces contaminées soient probablement en grande partie responsables de la contamination et de la recontamination d'autres animaux, les sols, les végétaux et les surfaces des enclos en contact avec des fèces contaminées représentent également des sources de transmission des STEC de l'environnement de l'élevage aux animaux. La capacité à former des biofilms de la souche MC2 dans différents milieux tels que la surface des végétaux ou des surfaces abiotiques pourrait également être étudiée à l'avenir afin de mieux caractériser les propriétés de persistance de cette souche. Par ailleurs, la souche MC2 dispose d'une importante batterie de facteurs de virulence impliqués dans différents aspects de la pathogénicité tels que la production de toxines Stx et la formation des lésions A/E. Ainsi, cette souche possède des caractéristiques communes aux souches cliniques O157:H7 et est donc à considérer comme potentiellement pathogène pour l'Homme.



Chapitre III Développement d'un modèle pour  
comprendre et maîtriser le portage digestif des EHEC  
chez les bovins





Cette étude a été réalisée en partenariat avec l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD) : UMR INSERM 1220 / INRA 1416 / ENVT / Université Paul Sabatier Toulouse 3. Un co-financement par FranceAgriMer et Interbev a été obtenu par l'ENVT et l'INRA.

Personnes impliquées à l'ENVT : T. Secher, D. Bibbal, M. Kerouredan, E. Bellec, H. Cassard, H. Brugère ; à l'INRA : A. Segura, M. Bertoni, P. Auffret, Y. Bertin, E. Forano

### III.1. Introduction

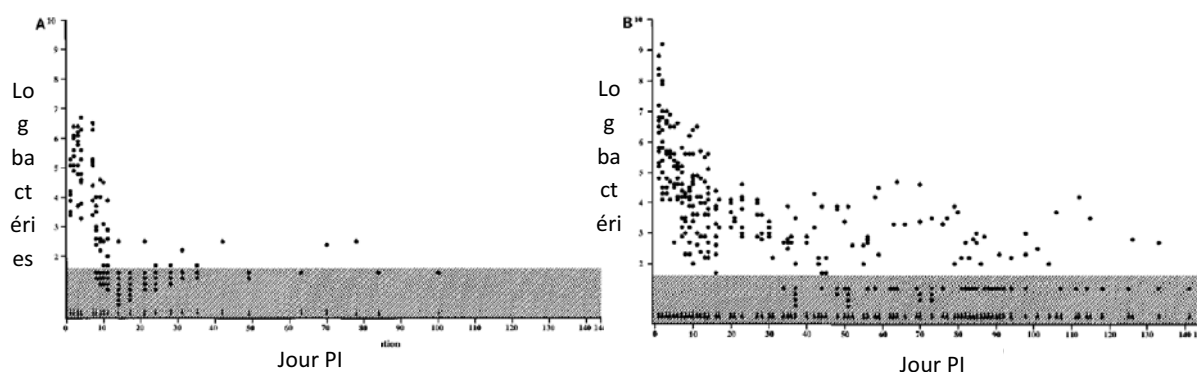
Les EHEC survivent dans le tractus gastro-intestinal du ruminant sain et sont ensuite disséminés par excrétion dans les matières fécales et contamination consécutive des produits de la chaîne alimentaire de l'Homme (produits animaux et végétaux et l'eau). Les EHEC semblent relativement bien adaptés à la survie tout au long du tube digestif animal. Cependant, les conditions de survie, de multiplication, de colonisation et d'excrétion des EHEC par l'animal ainsi que les facteurs qui peuvent faire varier ces paramètres sont encore largement méconnus. Le dernier objectif de la thèse était de développer un modèle animal bovin pour caractériser le portage et l'excrétion des EHEC pour une meilleure maîtrise de ce pathogène dans ce réservoir animal. La souche *E. coli* O157:H7 MC2, caractérisée dans le chapitre précédent, a été choisie pour inoculer les animaux, parce qu'elle avait été isolée récemment de troupeaux français et était persistante en élevage. Elle présentait donc des caractéristiques susceptibles de permettre une bonne colonisation du tube digestif des animaux inoculés. Les objectifs majeurs étaient de caractériser (i) la persistance de la souche STEC O157:H7 MC2 dans le tube digestif animal en suivant l'excrétion fécale de la souche dans les fèces, (ii) les sites préférentiels de multiplication et de colonisation de la souche MC2 et (iii) l'interaction entre le microbiote digestif et la souche STEC O157:H7 MC2. La finalité du projet était de mettre au point, pour la première fois en France, un modèle animal d'inoculation expérimentale de STEC O157:H7 permettant par la suite de tester *in vivo* des stratégies de lutte contre le portage de ce pathogène. En effet, en France, le taux de portage animal des STEC du top 5, et en particulier des STEC de sérotype O157:H7, est très faible (2% de prévalence en O157:H7 chez les jeunes bovins laitiers) (Bibbal *et al.*, 2015). Tester en élevage des solutions telles que des additifs alimentaires pour réduire le portage nécessite donc un nombre élevé d'animaux et représente ainsi un coût expérimental très élevé, outre les problèmes d'autorisation d'essai dans le cas, par exemple, d'additif microbien non autorisé. Un modèle expérimental bovin de portage et d'excrétion de STEC représente donc une étape intéressante pour tester et valider diverses solutions avant de passer aux tests en élevage.

### III.2. Inoculations expérimentales des bovins par des souches d'*E. coli* O157:H7

En amont de l'expérimentation animale, j'ai réalisé une étude bibliographique afin de définir les conditions expérimentales d'inoculation (âge des animaux, dose de l'inoculum et nombre d'inoculation).

## III.2.1. Âge des animaux

Dans la littérature, le portage et l'excrétion de souches *E. coli* O157:H7 ont été caractérisés par des inoculations expérimentales de veaux mais aussi de bovins adultes. Cependant, la concentration et la durée d'excrétion de souches STEC O157:H7 sont plus élevées chez les jeunes veaux (non sevrés et âgés de 3 à 14 semaines) que chez des bovins adultes (âgés de un an) inoculés expérimentalement avec  $10^{10}$  bactéries (Figure 1) (Cray & Moon, 1995). En effet, l'excrétion chez les veaux et les bovins adultes a été observée jusqu'à 20 et 14 semaines post-inoculation, respectivement. Bien que la concentration en STEC excrétés soit variable entre les animaux du même groupe d'âge, elle était significativement plus importante chez les veaux (entre  $10^1$  et  $10^4$  bactéries/g de fèces) que chez les bovins adultes ( $< 10^1$  bactéries/g de fèces), 18 jours post-inoculation (Figure 1) (Cray & Moon, 1995). Cette différence de concentration et de durée d'excrétion entre les animaux de groupes d'âge différent peut être liée à une fonction ruminale immature chez les jeunes veaux. En effet, dans le rumen des bovins adultes, la croissance des *E. coli* O157:H7 est inhibée par la forte concentration en acides gras volatiles et par l'acidité. Ainsi, la physiologie du tube digestif est différente en raison de l'âge et de l'alimentation des animaux mais aussi du système immunitaire. De plus, la variabilité de l'excrétion entre des animaux de même âge, de même provenance et ayant la même alimentation peut être expliquée par la différence de structure et de composition du microbiote digestif.



**Figure 1 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des bovins adultes (A) et des veaux (B),** adaptée de Cray & Moon (1995). La partie hachurée correspond à des dénombrements par enrichissement. PI : post-inoculation.

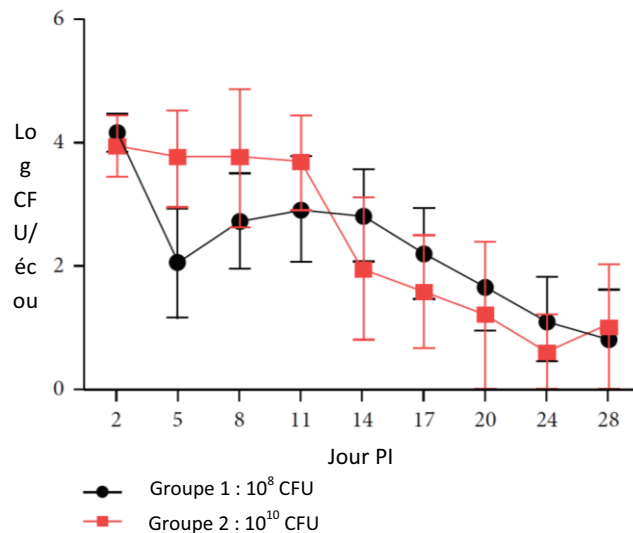
## III.2.2. Durée de l'excrétion

De nombreux travaux ont également étudié l'excrétion des souches *E. coli* O157:H7 chez des veaux et des résultats variables ont été observés pour une même dose d'inoculum ( $10^{10}$  CFU) (Brown *et al.*, 1997; Dziva *et al.*, 2007; Kieckens *et al.*, 2015; Ohya *et al.*, 1999). La durée d'excrétion peut varier de quelques jours à plusieurs semaines. Comme précédemment indiqué, cette différence peut être liée à l'âge des animaux, à leur alimentation mais aussi aux méthodes de dénombrement employées et à la souche *E. coli* O157:H7 inoculée (Gautam *et al.*, 2012; Kulow *et al.*, 2012). En effet, Gautam *et al.* (2012) ont montré que l'inoculation expérimentale de jeunes bovins avec des souches *E. coli* O157:H7 isolées d'un cas clinique, d'un raton laveur ou d'une ferme d'élevage impactait les niveaux et la durée d'excrétion (Gautam *et al.*, 2012). De manière générale, le profil d'excrétion observé entre les études est le même : après l'inoculation, une période de forte excrétion survient, suivie

d'une diminution progressive de l'excrétion, excepté pour certains animaux qui peuvent continuer d'excréter durant de longues périodes.

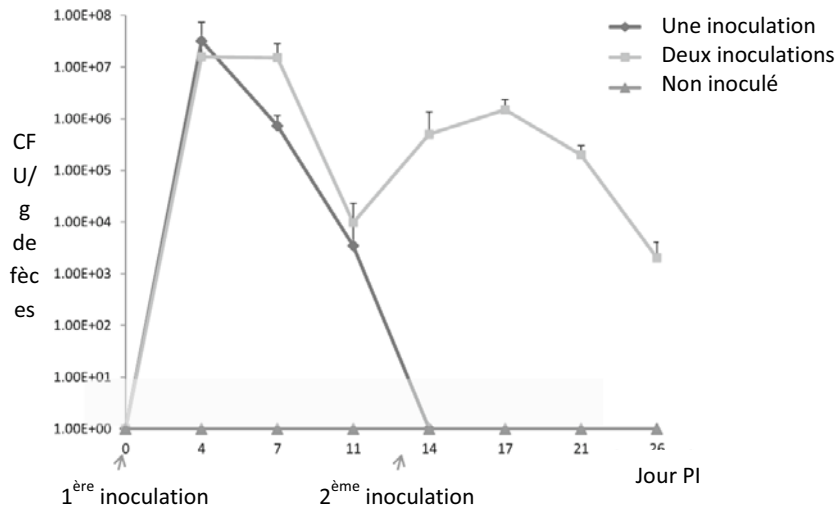
### III.2.3. Dose inoculée et répétition d'inoculation

Le portage et l'excrétion peuvent également varier en fonction de la quantité de bactéries inoculées aux animaux. L'inoculation d'animaux avec une faible quantité de bactéries ( $10^2$  à  $10^7$  bactéries) a conduit à des niveaux faibles de concentration dans les fèces (Besser *et al.*, 2001; Cray & Moon, 1995). Au contraire, les animaux inoculés avec  $10^8$  à  $10^{10}$  bactéries présentaient des concentrations dans les matières fécales plus élevées (Akiba *et al.*, 2000; Jonsson *et al.*, 2009; Martorelli *et al.*, 2015; Sanderson *et al.*, 1999). Une différence significative de la concentration en *E. coli* O157:H7 excrétés dans les fèces a néanmoins été observée entre des jeunes bovins (âgés de 9 mois) inoculés avec  $10^8$  bactéries et ceux inoculés avec  $10^{10}$  bactéries (Figure 2). Ces derniers présentaient un niveau d'excrétion plus élevé pendant les 11 premiers jours post-inoculation.



**Figure 2 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des jeunes bovins**, adaptée de Martorelli *et al.* (2015). PI : post-inoculation

L'excrétion a également été caractérisée suite à une deuxième inoculation avec la même souche bactérienne et avec une quantité identique (Cray & Moon, 1995; Jonsson *et al.*, 2009; Kieckens *et al.*, 2016; Naylor *et al.*, 2007; Sanderson *et al.*, 1999). La seconde inoculation ne restaure pas le niveau d'excrétion observé suite à la première inoculation (Figure 3). Il a été démontré que la ré-inoculation d'animaux avec la même souche bactérienne déclenchait une réponse immunitaire humorale qui pourrait réduire la quantité de bactéries excrétées (Jonsson *et al.*, 2009; Martorelli *et al.*, 2015). Cependant, suite à une ré-inoculation, la durée d'excrétion est plus longue (Figure 3), suggérant que la réponse immunitaire induite suite à la première inoculation n'a pas protégé les animaux d'une ré-inoculation et rend même les animaux plus susceptibles à une colonisation persistante (Kieckens *et al.*, 2016). Ainsi, les *E. coli* O157:H7 seraient capables de moduler la réponse immunitaire et une nouvelle inoculation pourrait être favorisée par une suppression de la réponse immunitaire.



**Figure 3 : Excrétion fécale d'une souche STEC O157:H7 par des veaux âgés de 5 semaines inoculés avec  $10^{10}$  bactéries**, adaptée de Kieckens *et al.* (2016). Les flèches sur l'axe des abscisses indiquent la première et la seconde inoculation. PI : post-inoculation

#### III.2.4. Colonisation du tube digestif

Bien que certains animaux aient présenté une diarrhée après l'inoculation, la majorité ne présente aucun signe clinique, et aucune lésion histologique au niveau du cerveau, du rein, de l'intestin grêle, du caecum et du côlon n'a été observée (Cray & Moon, 1995). Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la colonisation des différents segments digestifs des bovins suite à une inoculation expérimentale par des *E. coli* O157:H7 (Brown *et al.*, 1997; Cray & Moon, 1995; Dean-Nystrom *et al.*, 2008). Il a toutefois été montré que trois jours après l'inoculation de jeunes veaux (âgés de 3 à 14 semaines) avec  $10^{10}$  bactéries, la souche STEC O157:H7 inoculée a été détectée dans les contenus de rumen ( $10^2$  bactéries/g), d'iléon ( $10^2$  bactéries/g), de caecum ( $10^5$  bactéries/g) et de côlon ( $10^5$  bactéries/g) mais aussi dans les amygdales ( $10^2$  bactéries/g) et les nœuds lymphatiques mésentériques ( $10^1$  bactéries/g) (Cray & Moon, 1995). Les plus fortes concentrations ont été retrouvées au niveau des compartiments digestifs postérieurs indiquant une multiplication de la souche dans les contenus. Au bout de 18 jours post-inoculation, la souche STEC O157:H7 est toujours détectée mais à des concentrations plus faibles, notamment au niveau des contenus de caecum ( $10^2$  bactéries/g) et de côlon ( $10^1$  bactéries/g) (Cray & Moon, 1995). Des résultats similaires ont été observés chez des veaux de six semaines inoculés avec un mélange de cinq souches *E. coli* O157:H7 à  $10^{10}$  bactéries (Brown *et al.*, 1997). Par ailleurs, une souche STEC O157:H7 inoculée à  $10^{10}$  bactéries chez des veaux a été retrouvée au niveau des muqueuses iléale, cécale et colique (Dean-Nystrom *et al.*, 2008).

En conclusion, cette étude bibliographique a permis de définir les conditions de l'inoculation expérimentale suivante : inoculation à  $10^{10}$  bactéries, une seule ou deux inoculations successives, sur des jeunes bovins âgés de 3 mois. Ces conditions sont précisées ci-dessous.

### III.3. Matériels et méthodes

Les sections III.3.1., III.3.3., III.3.4. et III.3.5. de cette partie ont été réalisées par l'ENVT. La section III.3.2. a été réalisée par l'ENVT et l'INRA et la section III.3.6. a été réalisée par l'INRA. J'ai personnellement participé aux différents prélèvements après l'euthanasie des 3 groupes d'animaux, et réalisé l'ensemble des analyses du microbiote digestif.

#### III.3.1. Inoculation des animaux, dose de l'inoculum et suivi de l'excrétion fécale

L'expérimentation animale a concerné trois groupes de bovins (A, B et T) (Tableau 1). Chaque groupe était constitué de cinq jeunes bovins mâles de race laitière (Prim'Holstein), sevrés et âgés de trois mois (environ 100-150 kg). Les groupes A et B ont été inoculés avec la souche MC2 résistante à la rifampicine (Rif<sup>R</sup>) dans l'animalerie A3 de l'ENVT (Figure 4). Au préalable, l'absence de souches *E. coli* O157:H7 dans les matières fécales a été recherchée par PCR des gènes *eae-γ* et *rfbE<sub>O157</sub>*. De plus, l'absence de souches résistantes à la rifampicine dans les matières fécales bovines a été testée à l'aide d'une gélose Sorbitol McConkey (SMAC) additionnée de rifampicine à 100 µg/ml. Le groupe T (témoin), hébergé en animalerie conventionnelle, a reçu une solution de NaCl (Figure 4). Les trois groupes de bovins ont été nourris par un aliment complet de granulés à 30% de protéines additionné d'une base de paille, donné deux fois par jour. Quatre jours avant l'inoculation et avant le repas du matin, des fèces ont été prélevées au niveau du rectum. Un sondage ruminal a également été réalisé dans ces mêmes conditions à l'aide d'une sonde naso-œsophagienne en PET de 13 mm x 1,5 m. Une pompe à vide reliée à une fiole à vide a été utilisée pour prélever le contenu ruminal.

**Tableau 1 : Répartition et numéro des animaux des groupes A, B et T**

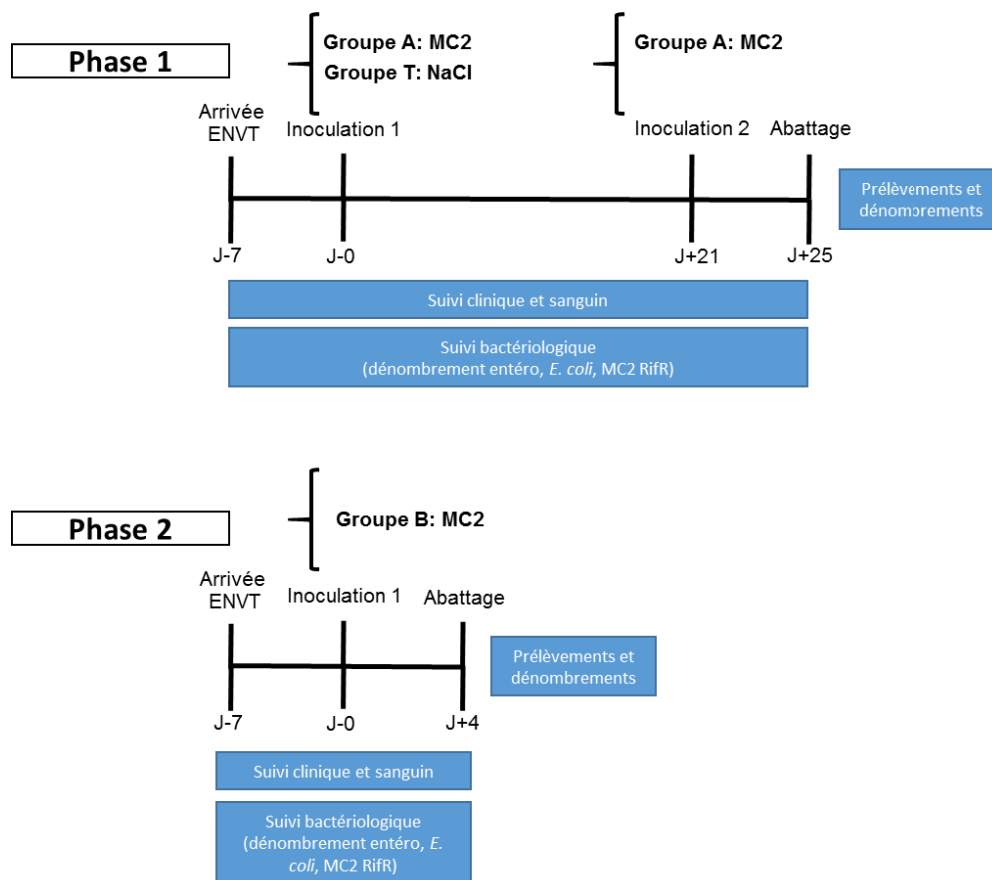
Groupe	Inoculum	N° des animaux
Groupe A	MC2 Rif <sup>R</sup> (Animalerie A3)	Box 1 : 26, 44
		Box 2 : 36, 45, 51
Groupe B	MC2 Rif <sup>R</sup> (Animalerie A3)	Box 1 : 55, 66
		Box 2 : 54, 57, 58
Groupe T	NaCl (Animalerie conventionnelle)	9, 15, 18, 23, 24



**Figure 4 : Photos de l'hébergement des bovins en animalerie A3 (A, B) et en animalerie conventionnelle (C, D)**

Pour l'inoculation, une solution de 20 ml contenant  $10^{10}$  bactéries MC2 Rif<sup>R</sup> a été préparée à partir de 10 colonies isolées sur une gélose SMAC additionnée de rifampicine (100 µg/ml), re-suspendues dans 100 ml de milieu Luria Bertani (LB) et incubée à 37°C pendant 12 heures. Une sonde œsophagienne en PET de 10 mm x 80 cm a été utilisée et un pas-d'âne a permis de guider la sonde sur laquelle était reliée une seringue de 60 ml. Un volume de 50 ml de NaCl, puis 20 ml de la suspension de MC2 Rif<sup>R</sup> à  $10^{10}$  bactéries, et à nouveau 50 ml de NaCl, ont été administrés aux bovins des groupes A et B. Une procédure identique a été suivie pour l'administration de 20 ml de NaCl aux bovins du groupe T. Après l'inoculation, les animaux ont reçu leur repas.

L'expérimentation animale a comporté deux phases (Figure 5). Au cours de la phase 1, l'excrétion fécale de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> (Groupe A) a été suivie pendant trois semaines. Les prélèvements de fèces ont été réalisés au niveau du rectum et stockés à 4°C. Une nouvelle inoculation de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> ( $10^{10}$  bactéries) a ensuite été effectuée à J21 (Groupe A) puis les bovins ont été euthanasiés quatre jours après la deuxième inoculation (Groupes A et T, J25). Au cours de la phase 2, les bovins du groupe B ont reçu une dose unique d'inoculum de MC2 Rif<sup>R</sup> ( $10^{10}$  bactéries) et l'excrétion fécale de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> a été mesurée pendant 4 jours, puis les animaux ont été euthanasiés. Un suivi clinique (température, appétit et état général), sanguin (numération formule sanguine) et biochimique (créatinine, urée, ASAT [aspartate-aminotransférase], créatine kinase et γGT [glutamyl-transpeptidase]) a également été réalisé. Les bovins ont été euthanasiés par injection de T61 (1 ml/10 kg) par voie intraveineuse lente dans la veine jugulaire lorsqu'ils excrétaient la souche MC2 Rif<sup>R</sup> à des niveaux supérieurs ou égaux à  $10^4$  bactéries/g de fèces (correspondant à des animaux super-excréteurs). Ils ont ensuite été immédiatement transférés vers la salle d'autopsie (A3 ou conventionnelle) et différents prélèvements ont été effectués. La Figure 5 récapitule les deux phases expérimentales.



**Figure 5 : Phases expérimentales de l'étude**

### III.3.2. Les prélèvements

Dans la salle d'autopsie, des prélèvements externes sur les cuirs au niveau de la ligne blanche, des oreilles et des conduits auriculaires ont été réalisés à l'aide de chiffonnettes distinctes et imbibées de NaCl. Chaque chiffonnette a été conservée à 4°C dans un sac Stomacher®. L'abdomen des bovins a ensuite été ouvert et les nœuds lymphatiques iléo-caecaux et mésentériques caudaux immédiatement prélevés. Les amygdales ont également été prélevées. Des biopsies de 1 cm<sup>2</sup> des nœuds lymphatiques et des amygdales ont été réalisées et placées dans du milieu Tryptone Soja (TSB pour « Tryptic Soya Broth) modifié additionné de rifampicine à 100 µg/ml. Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. Les différentes zones de prélèvements digestifs ont ensuite été repérées, ligaturées et prélevées. Les segments digestifs ont été ouverts et leur contenu collecté. Les prélèvements des contenus du rumen, de l'iléon, du caecum, du côlon spiralé et du côlon descendant ont été récupérés et stockés à 4°C ou congelés dans l'azote liquide avant stockage à -20°C ou à -80°C selon leur destination. La phase liquide du contenu de rumen a été prélevée au niveau du sac ventral. Le contenu du rectum a été prélevé le matin de l'autopsie et stocké dans les mêmes conditions. Enfin, des segments des parois intestinales ont été prélevés, puis lavés trois fois dans une solution de tampon phosphate salin (PBS pour « Phosphate Buffered Saline »). Des biopsies de 50 mm<sup>2</sup> ont été réalisées sur les parois intestinales du rumen, de l'iléon, de la valvule iléo-caecale, du côlon spiralé,

du côlon descendant et de la jonction recto-anale. Ces biopsies ont été stockées dans du milieu TSB à 4°C ou congelées dans l'azote liquide avant stockage à -20°C ou à -80°C.

Les différents prélèvements réalisés chez les trois groupes de bovins le jour de l'euthanasie sont indiqués dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Prélèvements effectués chez les trois groupes de bovins au moment de l'autopsie**

	Groupe A	Groupe B	Groupe T
Cuir et oreilles	+	+	-
Nœuds lymphatiques	+	+	-
Amygdales	+	+	-
Contenus digestifs	+	+	+
Parois digestives	+	+	+

+ : prélevé

- : non prélevé

### III.3.3. Dénombrements de la souche MC2 Rif<sup>R</sup>

#### III.3.3.1. Fèces, contenus digestifs et parois digestives

Un total de 10 g de fèces ou de contenus digestifs a été placé dans un sac Stomacher<sup>®</sup> avec 90 ml de milieu TSB, puis malaxé pendant 2 minutes au Stomacher<sup>®</sup>. Cette suspension a ensuite été diluée en série au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu TSB. Les biopsies des parois stockées dans du milieu TSB ont été broyées deux fois pendant 20 secondes à 6000 rotations par minute (rpm). Un volume de 500 µl de cette suspension a été prélevé et des dilutions en série au 1/10<sup>ème</sup> ont été réalisées dans du milieu TSB.

Un volume de 100 µl des suspensions de fèces, de contenus et de tissus a été déposé en duplicat sur une gélose SMAC additionnée de 100 µg/ml de rifampicine pour le dénombrement de la souche MC2 Rif<sup>R</sup>. Les géloses ont été incubées à 37°C sur la nuit. Pour les prélèvements présentant une concentration inférieure à 100 bactéries/g de contenu ou à 100 bactéries/mm<sup>2</sup> de paroi, un dénombrement a été réalisé par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Pour cela, 1 ml des dilutions préalablement réalisées dans le milieu TSB a étéensemencé en duplicat dans 4 ml de TSB modifié additionné de rifampicine à 100 µg/ml. Les tubes ont été incubés sur la nuit à 37°C. La présence de MC2 Rif<sup>R</sup> dans les tubes positifs a été confirmée par isolement sur une gélose SMAC additionnée de rifampicine (100 µg/ml). Le dénombrement a été réalisé grâce à l'utilisation de la table de McGrady. Les résultats ont été exprimés en NNP/g ou en NPP/mm<sup>2</sup>.

#### III.3.3.2. Les oreilles, les cuirs, les amygdales et les nœuds lymphatiques

Les chiffonnettes des cuirs, des oreilles et des conduits auriculaires ont été transférées dans un sac Stomacher<sup>®</sup> avec 90 ml de milieu TSB modifié additionné de 100 µg/ml de rifampicine. Le sac a été malaxé pendant deux minutes au Stomacher<sup>®</sup> et incubé à 37°C pendant 18 heures. Les biopsies des amygdales et des nœuds lymphatiques, stockés dans du milieu TSB modifié additionné de rifampicine à 100 µg/ml, ont été broyées deux fois pendant 20 secondes à 6000 rpm. Les tubes ont ensuite été incubés à 37°C pendant 18 heures. Après enrichissement, les suspensions ont étéensemencées sur une gélose SMAC additionnée de rifampicine à 100 µg/ml et incubées à 37°C.



#### III.3.4. Histologie

Les biopsies des parois intestinales ont été immédiatement immergées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures à température ambiante puis dans l'éthanol 70%. Les échantillons ont été ensuite inclus en paraffine et des coupes de 5 µm ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline-éosine pour les observations anatomo-pathologiques.

#### III.3.5. Test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

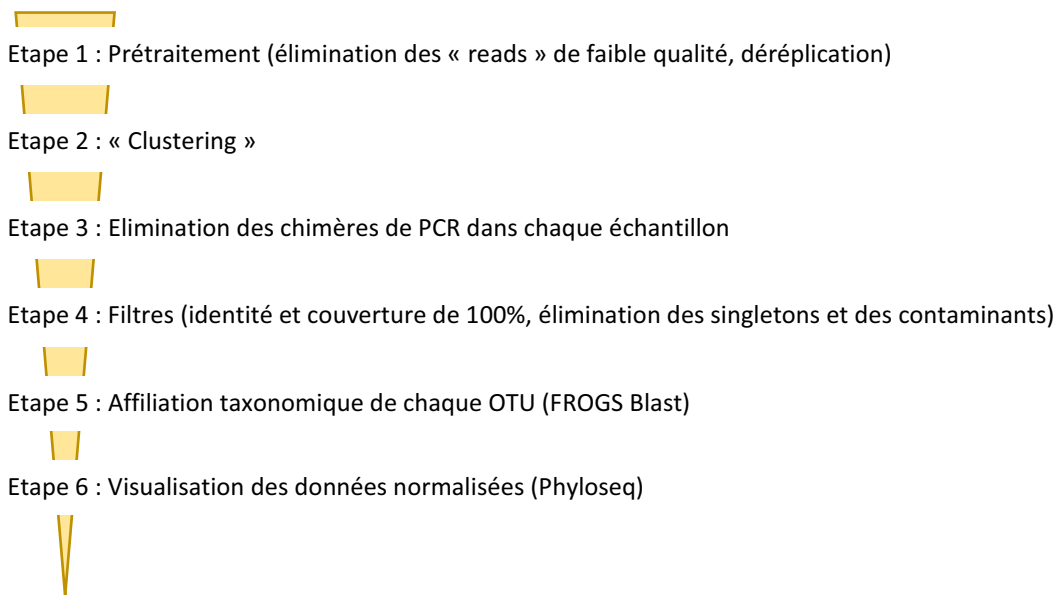
Les biopsies et les sera ont été testés par ELISA pour la production d'interféron-γ (IFNγ) et d'interleukines-1β (IL1β). Pour cela, les biopsies de l'iléon et du rectum des bovins des groupes A, B et T ont été immédiatement placées dans un puits d'une plaque 24 puits (Falcon) avec 500 µl de milieu DMEM-GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de 10% de sérum de veaux fœtal, d'acides aminés non essentiels 1X, de gentamicine à 80 µg/ml, de fongizone 1X et de pénicilline streptomycine [Pen Strep] 1X) et incubée 24 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le surnageant a été collecté, filtré à 0,22 µm et stocké à -80°C. Le sang total des 3 groupes d'animaux collecté dans un tube sec a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le sérum a ensuite été prélevé puis clarifié par une deuxième centrifugation et stocké à -80°C. L'IFNγ et l'IL1β ont été dosés en suivant les instructions des kits Bovine IFN Gamma ELISA Reagent et Bovine IL-1 Beta ELISA Reagent (ThermoScientific). La limite de détection a été évaluée à 78 pg/ml.

#### III.3.6. Analyse de la diversité du microbiote endogène

Les ADN totaux du microbiote des contenus digestifs et ceux du microbiote à la surface des parois digestives (préalablement conservés à -80°C) issus du rumen, de l'iléon, du caecum, de la valvule iléo-caecale, du colon spiralé, du côlon descendant et du rectum des bovins des groupes A et T ont été extraits à l'aide du kit ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research) selon les recommandations du fabricant. Les ADN totaux des contenus de rumen et des fèces prélevés 4 jours avant l'inoculation des animaux ont également été extraits par ce même kit. Les ADN extraits ont ensuite été dosés au Qubit 3.0 (Invitrogen) et une quantité de 100 ng a été déposée sur un gel d'agarose 0,8%. L'analyse de la composition en microorganismes a été réalisée par séquençage de fragments amplifiés avec des amorces ciblant les gènes de l'ADNr 16S bactérien (région V4, amorces\_515FNew/806RNew : 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA / 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT). Ces amorces ont également reconnu des séquences d'archées visibles dans les « bar plot » (en gris). Nous avons choisi de ne pas les supprimer afin de ne pas modifier les abondances relatives des séquences bactériennes. Cependant, nous n'avons pas pris en compte ces séquences dans nos résultats, car elles ne sont pas représentatives de toutes les séquences d'Archées.

Les amorces ont été choisies afin d'avoir un recouvrement des séquences « forward » et « reverse », en vue d'utiliser le pipeline automatique FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution). Le séquençage a été réalisé sur Illumina Mi-Seq V2, à la plateforme du Keck Center for Comparative and Functional Genomics, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de la plateforme Galaxy et du pipeline FROGS développé à l'INRA de Toulouse

(bioinfo.genotoul.fr) à partir des fichiers contenant les « reads » démultiplexés selon le workflow suivant :



**Figure 6 : Workflow suivi pour les analyses des données du séquençage de l'ADNr 16S bactérien**

## III.4. Résultats

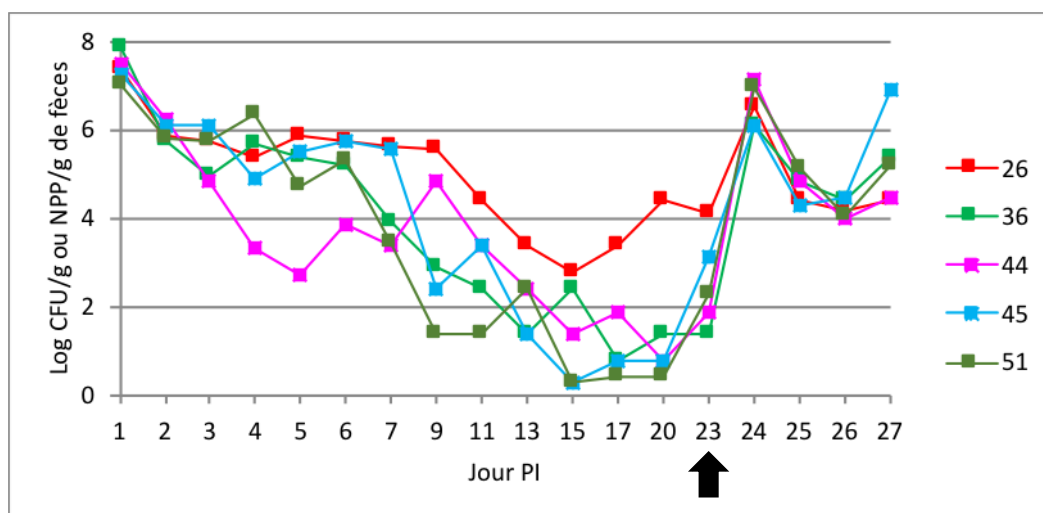
### III.4.1. Suivi clinique des bovins et des paramètres sanguins et biochimiques

Pour les groupes A, B et T, de la toux et des épisodes de fèces molles ont été occasionnellement constatés tout au long de l'expérimentation animale. Pour les groupes A et B, des épisodes d'hyperthermie ont été relevés 7 jours post-inoculation pour deux bovins du groupe A (N°44 et N°51) et 5 jours avant l'inoculation pour trois bovins du groupe B (N°54, N°55 et N°66). Ils ont été traités avec du METACAM® à la dose de 0,5 mg/kg par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Une étiologie respiratoire a été suspectée. Ces épisodes hyperthermiques ont duré entre 2 et 4 jours avant résolution. L'état général des bovins n'a pas été affecté. Par ailleurs, 4 jours avant l'inoculation, une augmentation transitoire des neutrophiles a été observée chez trois bovins du groupe B (N°54, N°55 et N°57) dont deux présentaient une hyperthermie. Chez les animaux du groupe A, une augmentation du nombre d'éosinophiles a été détectée par rapport aux bovins du groupe T. Mis à part cet évènement, l'inoculation de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> n'a pas eu d'impact sur les paramètres sanguins, ni sur les différents paramètres biochimiques mesurés. Enfin, aucune anomalie macroscopique n'a été constatée lors de l'examen anatomo-pathologique réalisé au moment de l'autopsie.

### III.4.2. Suivi de l'excrétion fécale de la souche MC2 Rif<sup>R</sup>

#### III.4.2.1. Chez les bovins du groupe A

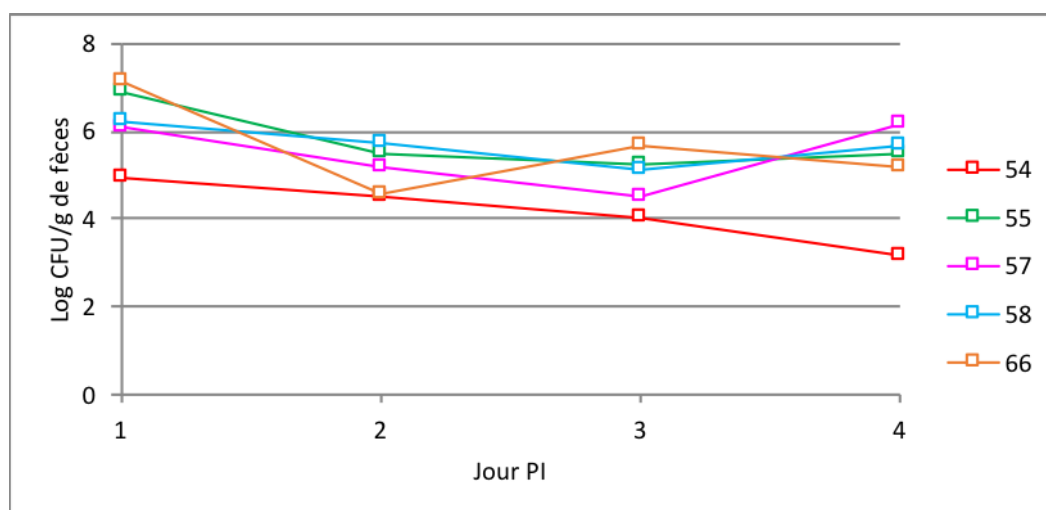
Suite à la première inoculation, à J1, la concentration de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> était en moyenne de  $3,03 \times 10^7$  CFU/g de fèces (Figure 7). Dès le deuxième jour post-inoculation, la concentration en bactéries excrétées a diminué à une valeur moyenne de  $9,76 \times 10^5$  CFU/g de fèces (Figure 7). La concentration de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> excrétée est restée au-dessus de  $10^4$  CFU/g jusqu'à 6 jours post-inoculation, sauf pour l'animal N°44 (Figure 7). A partir du jour 7, la variabilité d'excrétion entre les bovins s'est accentuée. Le bovin N°26 a présenté des concentrations en MC2 Rif<sup>R</sup> excrétés supérieures à celles des autres animaux. A partir du jour 9, des concentrations variant entre moins de  $10^1$  et  $10^4$  NPP/g de fèces ont été observées, avec de grandes variations inter-animales (Figure 7). La souche MC2 a été détectée chez tous les bovins jusqu'au 23<sup>ème</sup> jour post-inoculation, jour de la deuxième inoculation. Suite à la deuxième inoculation, la concentration en MC2 Rif<sup>R</sup> excrétés à J24 était supérieure à  $10^6$  CFU/g de fèces pour tous les animaux. Les 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jours suivant cette ré-inoculation, les concentrations en MC2 Rif<sup>R</sup> étaient comprises entre  $10^4$  et  $10^7$  CFU/g de fèces (Figure 7). Comme attendu, la deuxième inoculation n'a pas restauré les niveaux d'excrétion de la souche observés suite à la première inoculation.



**Figure 7 : Concentrations de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> excrétée dans les matières fécales des bovins du groupe A.** Les résultats sont exprimés en log de CFU/g de fèces de J0 à J9 et de J24 à J27 et en log de NPP/g de fèces de J11 à J23. La flèche indique la deuxième inoculation. PI : post-inoculation

#### III.4.2.2. Chez les bovins du groupe B

Les bovins du groupe B n'ont reçu qu'une seule inoculation. Les concentrations moyennes de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> excrétée dans les fèces sont similaires à celles obtenues après la première inoculation des bovins du groupe A pour la même période de temps, indiquant que le modèle développé est reproductible (Figure 8). De même, une variabilité de l'excrétion de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> a été observée, mais cette fois dès le premier jour post-inoculation (Figure 8). Le bovin N°54 a présenté des concentrations en MC2 Rif<sup>R</sup> excrétés inférieures à celles des autres.



**Figure 8 : Concentrations de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> excrétée dans les matières fécales des bovins du groupe B.** Les résultats sont exprimés en log de CFU/g de fèces. PI : post-inoculation

### III.4.3. Détection de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans les différents prélèvements

#### III.4.3.1. Sur les cuirs et dans les oreilles

La souche MC2 Rif<sup>R</sup> a été détectée au niveau des cuirs et des oreilles pour l'ensemble des bovins des groupes A et B, indiquant une contamination de l'environnement des bovins.

#### III.4.3.2. Au niveau des amygdales et des nœuds lymphatiques digestifs

Parmi les bovins des groupes A et B, trois dans chaque groupe étaient positifs pour la présence de MC2 Rif<sup>R</sup> dans les amygdales (Tableau 3). Aucune biopsie des nœuds lymphatiques iléo-caecaux et mésentériques caudaux ne s'est révélée positive pour la présence de MC2 Rif<sup>R</sup>.

**Tableau 3 : Détection de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans les amygdales des bovins des groupes A et B**

<b>Groupe A</b>					
<b>26</b>	<b>36</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>51</b>	
+	-	+	+	-	
<b>Groupe B</b>					
<b>54</b>	<b>55</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>66</b>	
-	+	+	+	-	

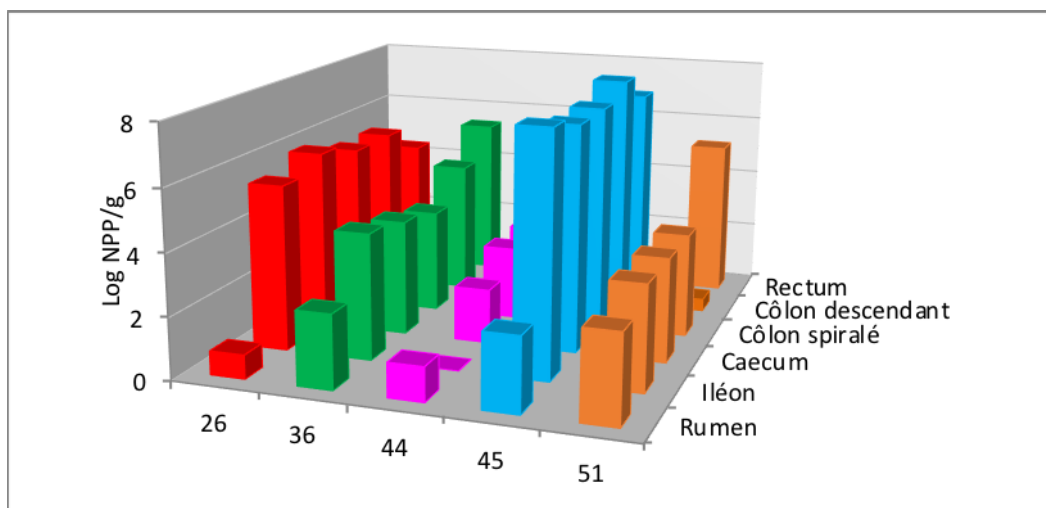
+ : détection de MC2 Rif<sup>R</sup>

- : pas de détection de MC2 Rif<sup>R</sup>

### III.4.4. Dénombrements de la souche MC2 Rif<sup>R</sup>

#### III.4.4.1. Dans les contenus digestifs des bovins du groupe A

Une grande variabilité de la concentration en MC2 Rif<sup>R</sup> a été observée entre les animaux pour les différents contenus digestifs (Figure 9). L'animal N°44 avait les concentrations les plus faibles (environ 10<sup>2</sup> NPP/g) et le N°45, les plus fortes (>10<sup>6</sup> et jusqu'à 10<sup>7</sup> NPP/g), pour quasiment tous les segments digestifs analysés. Rappelons qu'au moment de l'euthanasie, le bovin N°45 excréta la souche MC2 Rif<sup>R</sup> à des concentrations supérieures aux autres (> à 10<sup>6</sup> CFU/g de fèces). Le contenu de rumen est le segment le moins colonisé par MC2 Rif<sup>R</sup> chez tous les animaux. En effet, dans ce compartiment, la souche MC2 Rif<sup>R</sup> a été détectée à une concentration moyenne de 2,44 x 10<sup>2</sup> CFU/g de contenu (Figure 9). Au niveau des contenus de l'iléon, du caecum, du côlon spiralé, du colon descendant et du rectum, les concentrations moyennes étaient supérieures à 10<sup>4</sup> CFU/g de contenu, indiquant que dans ces contenus, la souche MC2 Rif<sup>R</sup> s'est multipliée (Figure 9). Pour les animaux 36 et 51, avec de plus faibles taux de colonisation des segments intestinaux, le rectum présentait la plus forte concentration en MC2 Rif<sup>R</sup>, suggérant là encore une multiplication de la souche dans ce compartiment.

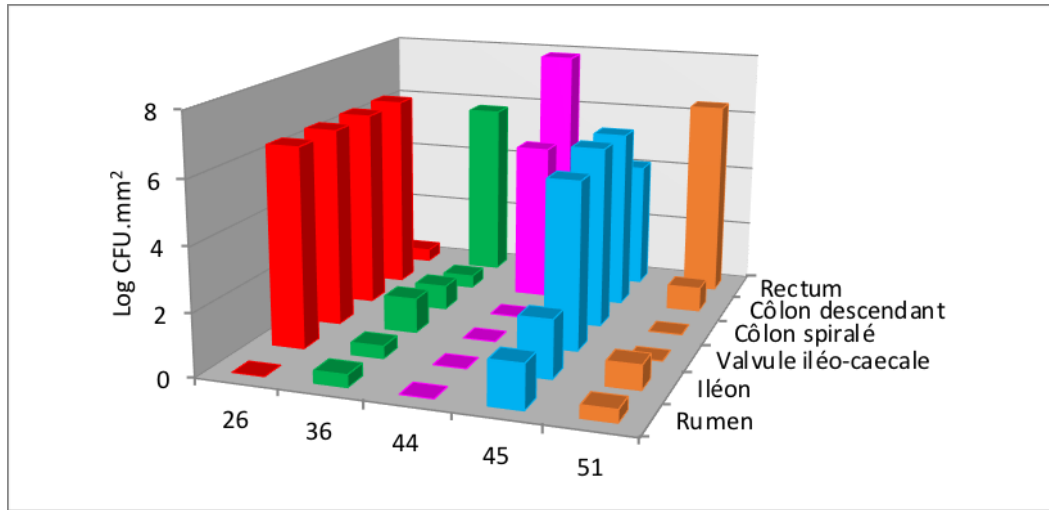


**Figure 9 :** Concentrations de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans les contenus digestifs des bovins du groupe A. Les résultats sont exprimés en log de NPP/g de contenu

#### III.4.4.2. A la surface des parois digestives des bovins du groupe A

Les profils d'adhésion de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> aux parois digestives obtenus pour chaque animal sont très différents (Figure 10). Pour les bovins N°36, N°45 et N°51, la souche MC2 Rif<sup>R</sup> a été détectée au niveau de la paroi ruminale à des concentrations très basses, et la souche n'était pas détectée sur la paroi ruminale des animaux N°26 et N°44 (Figure 10). Les concentrations les plus élevées (entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>8</sup> NPP/mm<sup>2</sup>) ont été observées au niveau de la jonction recto-anale des animaux N° 36, N°44, N°45 et N°51. Au niveau des parois de l'iléon, de la valvule iléo-caecale, du côlon spiralé et du côlon descendant, les concentrations en MC2 Rif<sup>R</sup> sont variables entre les bovins (Figure 10). Le bovin N°26 présentait des concentrations supérieures à 10<sup>6</sup> NPP/mm<sup>2</sup> pour ces parois. Excepté pour la paroi iléale, le N°45 affichait des concentrations supérieures à 10<sup>5</sup> NPP/mm<sup>2</sup>. Ces deux animaux

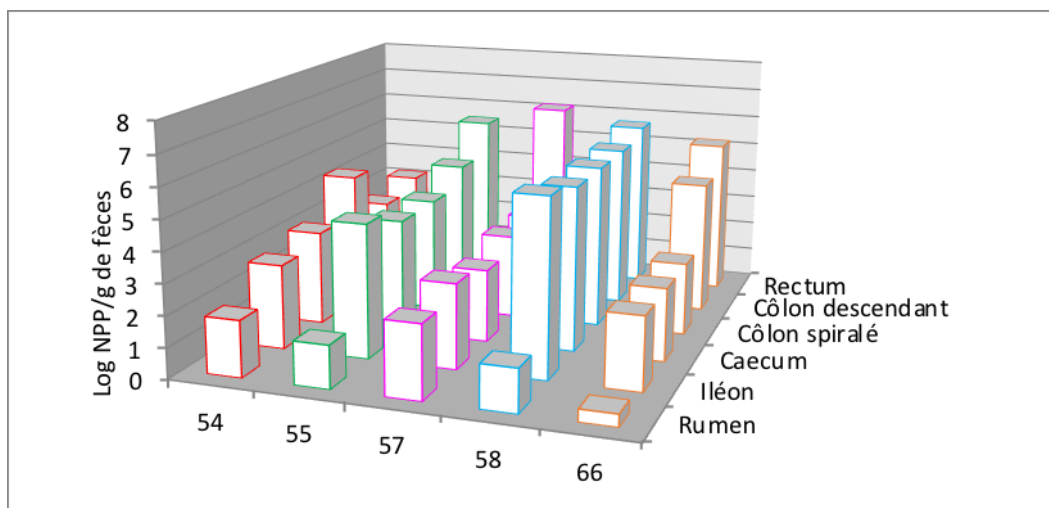
présentaient également les concentrations les plus élevées en MC2 Rif<sup>R</sup> dans les contenus digestifs (Figure 10).



**Figure 10 : Concentration de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> adhérentes aux parois digestives des animaux du groupe A.** La paroi du rectum correspond à la jonction recto-anale. Les résultats sont exprimés en log de NPP/mm<sup>2</sup> de paroi digestive

III.4.4.3. Dans les contenus digestifs des bovins du groupe B

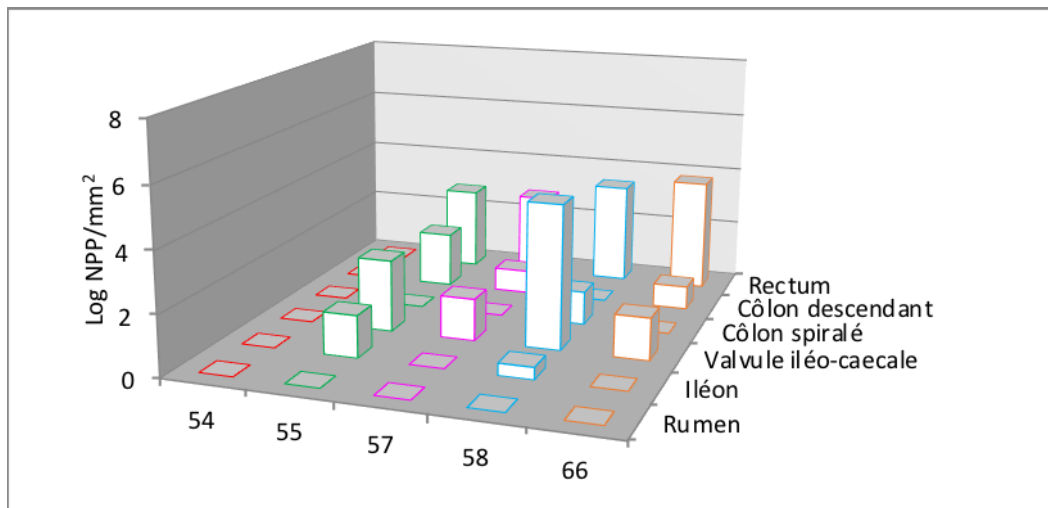
Les concentrations relatives de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans les différents contenus digestifs des bovins du groupe B sont assez comparables à celles obtenues pour le groupe A (Figure 9, Figure 11). En effet, les concentrations les plus basses ont été observées dans le contenu ruminal et sont plus élevées dans les autres compartiments, notamment dans le rectum (Figure 11). Cependant, en comparaison avec les animaux du groupe A, les concentrations moyennes du groupe B sont inférieures. De manière similaire au groupe A, une grande variabilité entre les animaux du groupe B a été observée (Figure 11). Le bovin N°58 avait les concentrations en MC2 Rif<sup>R</sup> les plus élevées.



**Figure 11 : Concentrations de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans les contenus digestifs des bovins du groupe B.** Les résultats sont exprimés en log de NPP/g de contenu

## III.4.4.4. A la surface des parois digestives des bovins du groupe B

Chez plus de la moitié des biopsies de parois digestives prélevées chez les animaux du groupe B, la souche MC2 Rif<sup>R</sup> n'a pas été détectée, notamment au niveau de la paroi du rumen (Figure 12). La souche MC2 Rif<sup>R</sup> n'a également pas été détectée à la surface des parois digestives de l'animal N°54. Cependant, la jonction recto-anale et la valvule iléo-caecale étaient les seuls sites colonisés par la souche chez l'ensemble des animaux du groupe B, excepté le N°54 (Figure 12). Enfin, les concentrations de bactéries MC2 Rif<sup>R</sup> adhérentes observées sur les parois étaient variables entre les bovins.



**Figure 12 : Concentrations de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> adhérente aux parois digestives des animaux du groupe B.** La paroi du rectum correspond à la jonction recto-anale. Les résultats sont exprimés en log de NPP/mm<sup>2</sup> de paroi digestive

## III.4.5. Analyses histologiques

Comme indiqué précédemment, peu de bactéries MC2 Rif<sup>R</sup> ont été retrouvées en contact avec les parois digestives des animaux. Des altérations microscopiques ont néanmoins été observées au niveau des parois iléales et rectales des animaux du groupe A en comparaison avec celles du groupe T (Figure 13, Figure 14). Un effacement des microvillosités intestinales ou une abrasion des cellules épithéliales ainsi que des cellules épithéliales et stromales exfoliées dans la lumière intestinale ont été observés. Ces mêmes altérations ont été observées chez les bovins du groupe B avec une amplitude moins importante.

Une autre caractéristique dépendante de l'infection était la présence accrue et massive d'éosinophiles au niveau de la muqueuse intestinale. Une augmentation d'un facteur 6 a été mesurée chez les individus du groupe A en comparaison avec ceux du groupe T (Résultats non montrés). Cette augmentation a également été constatée au niveau des muqueuses de la valvule iléo-caecale et du côlon.

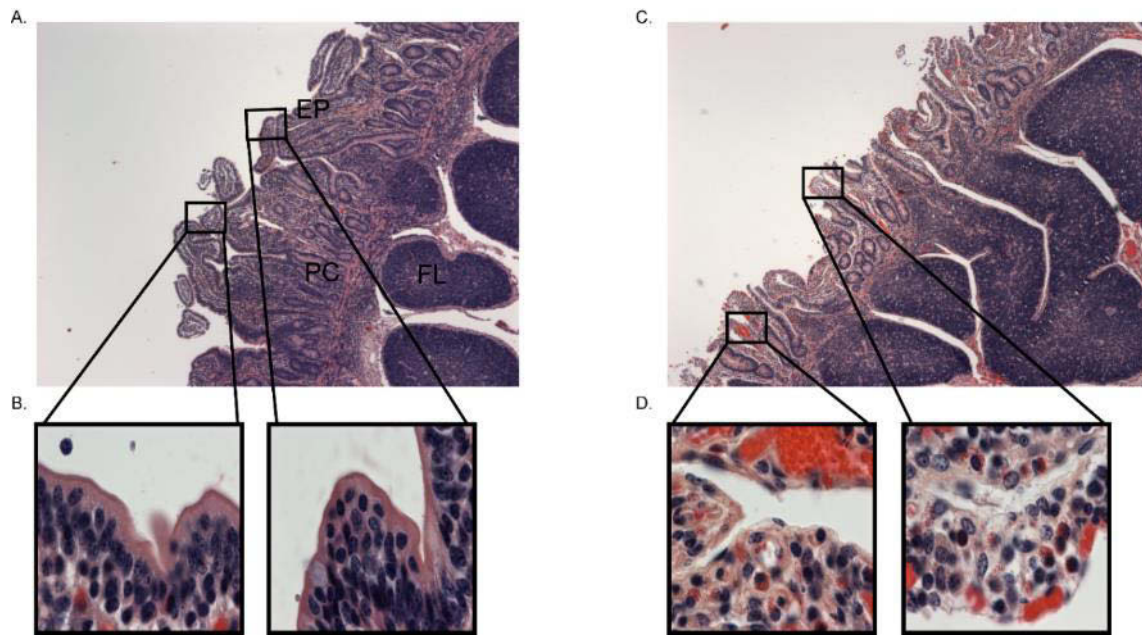


Figure 13 : Analyse histologique de la paroi iléale du bovin N°24 du groupe T (A, B) et du bovin N°45 du groupe A (C, D). EP : épithélium, FL : follicule lymphoïde, PC : pseudo-crypte. Agrandissements x40 et x1000

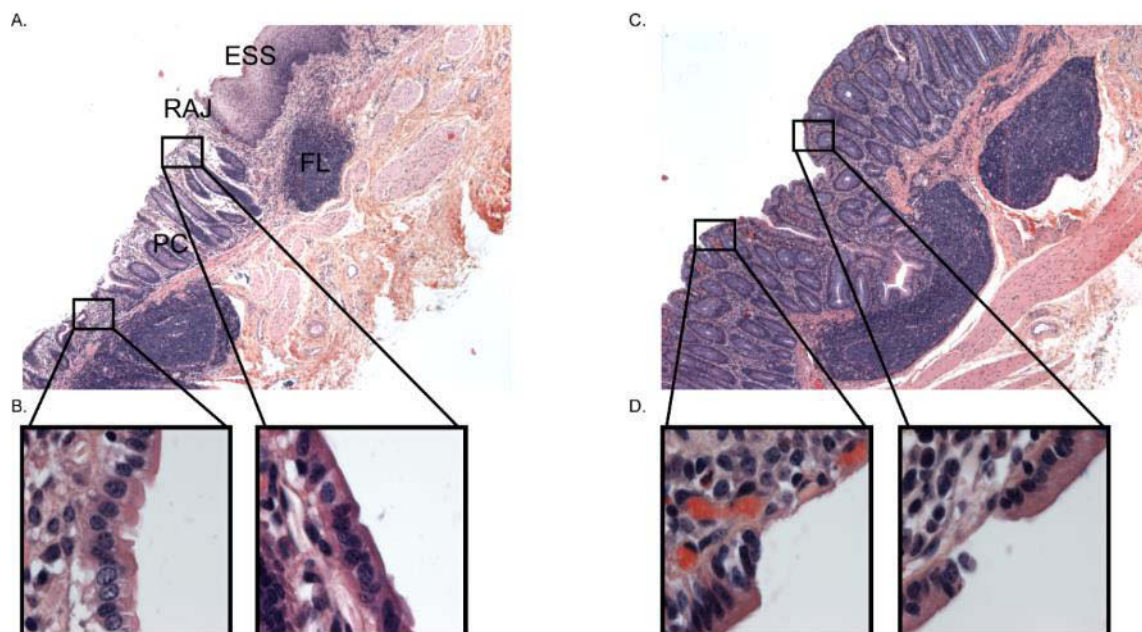


Figure 14 : Analyse histologique de la paroi rectale du bovin N°9 du groupe T (A, B) et du bovin N°44 du groupe A (C, D). EP : épithélium, FL : follicule lymphoïde, PC : pseudo-crypte. Agrandissements x40 et x1000

#### III.4.6. Réponse inflammatoire

Une production accrue d'IFN $\gamma$  et d'IL1 $\beta$  a été observée au niveau des muqueuses de l'iléon des bovins du groupe A mais pas chez ceux du groupe B dont la production de ces médiateurs était similaire à celle du groupe T (Résultats non montrés). Au niveau des muqueuses intestinales du rectum, une production d'IL1 $\beta$  a également été observée chez les animaux du groupe A et d'IFN $\gamma$



chez ceux du groupe B (Résultats non montrés). La production de ces cytokines pro-inflammatoires a également été recherchée au niveau systémique. Il a été observé une production importante d'IFN $\gamma$  chez les animaux infectés par la souche MC2 Rif<sup>R</sup> (Résultats non montrés).

### III.4.7. Diversité des communautés bactériennes des contenus digestifs

#### III.4.7.1. Description générale

Les contenus digestifs et les fèces prélevés sont répertoriés dans le tableau 4. Le séquençage de l'ADNr 16S bactérien de l'ensemble des contenus digestifs et des fèces prélevées chez les animaux des groupes A et T a généré un nombre total de 5 944 406 de « reads » avec une moyenne de 37 153  $\pm$  346,1 « reads » par échantillons. Le nombre total d'Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) détecté était de 1415 (identité et couverture de 100%, OTU présente dans au moins deux échantillons, au moins deux séquences présentes dans une OTU). Le tableau 4 a révélé que (i) le nombre d'OTU, l'index Shannon et l'indice Chao des communautés bactériennes différaient entre les prélèvements effectués pour un même groupe de bovins et que (ii) ces paramètres sont plus élevés chez les animaux du groupe T que chez les animaux du groupe A quel que soit le prélèvement effectué (Tableau 4). En effet, les fèces prélevées avant l'inoculation et les contenus de côlon spiralé et de côlon descendant prélevés le jour de l'euthanasie des animaux du groupe T ont présenté un nombre d'OTU significativement plus important que ceux du groupe A (Tableau 4). De plus, les contenus de caecum du groupe T avaient un indice Chao significativement plus important que celui du groupe A. Enfin, la diversité bactérienne était significativement plus importante chez les animaux du groupe T pour les contenus de rumen prélevés avant l'inoculation et de rumen, d'iléon et de caecum prélevés le jour de l'euthanasie (Tableau 4).

**Tableau 4 : Nombre de « reads », unités taxonomiques opérationnelles (OTU), index Shannon et indice Chao des communautés bactériennes des contenus digestifs et fèces des bovins des groupes A et T**

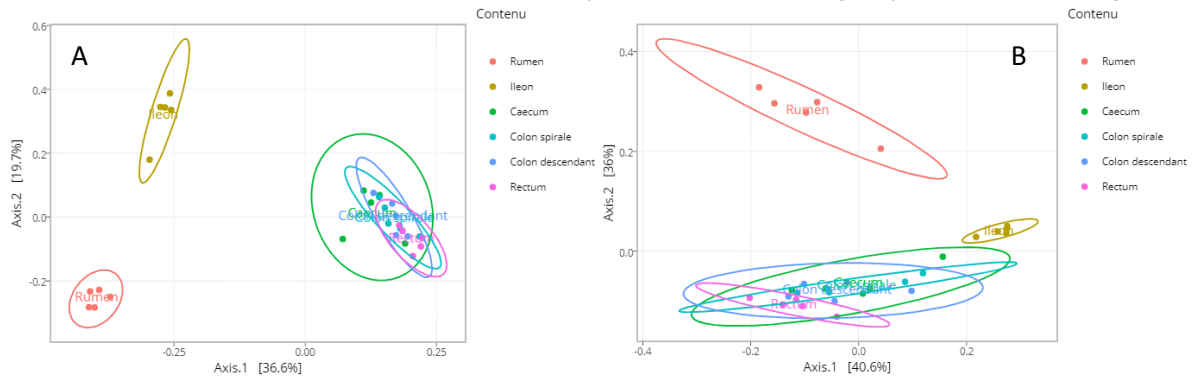
Sample ID	# Séquence		# OTU		Indice Chao		Index Shannon	
	Groupe A	Groupe T	Groupe A	Groupe T	Groupe A	Groupe T	Groupe A	Groupe T
Rumen avant inoculation	36 827	40 740	376	435	359,6	421,8	3,5	4,5*
Fèces avant inoculation	36 731	40 769	287	323**	275,5	298,1	4,0	4,0
Rumen (à l'euthanasie)	37 408	39 789	421	470	381,5	438,7	3,9	4,5*
Iléon (à l'euthanasie)	36 352	38 010	144	160	124,1	149,6	2,6	2,8**
Caecum (à l'euthanasie)	35 683	35 140	311	341	291,0	336,6*	4,0	4,2*
Côlon spiralé (à l'euthanasie)	36 568	35 965	300	337*	286,1	319,8	3,9	4,2
Côlon descendant (à l'euthanasie)	33 096	36 298	296	339*	290,4	322,5	4,0	4,3
Rectum (fèces à l'euthanasie)	35 515	39 549	317	331	306,2	312,5	4,2	4,3

\*, \*\*: différence significative entre le groupe A et le groupe T (Test t de Student). \*, p < 0,05 ; \*\*, p < 0,01

#### III.4.7.2. Diversité bactérienne des contenus digestifs le jour de l'euthanasie

Afin de mettre en évidence des différences de diversité et d'abondance des communautés bactériennes, une analyse en composante principale (PCoA) a été réalisée. La PCoA a indiqué des différences de diversité (Figure 15A) et d'abondance (Figure 15B) des communautés bactériennes entre les contenus prélevés à différents sites du tube digestif des animaux du groupe A le jour de

l'euthanasie, à l'exception des contenus de caecum, de côlon spiralé, de côlon descendant et de rectum. Des résultats similaires ont été obtenus pour les animaux du groupe T (Annexe 2 : Figure S1).



**Figure 15 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des animaux du groupe A. (A) méthode unweighted Unifrac ; (B) méthode weighted Unifrac. Le pourcentage de variation expliqué par PC1 et PC2 est indiqué sur les axes**

Parmi les différents sites du tube digestif prélevés, le nombre de phyla le plus important a été détecté dans les contenus de rumen des animaux des groupes A et T (18 et 19 phyla, respectivement) alors que le plus faible nombre a été observé dans les contenus de côlon spiralé du groupe A (8 phyla) et dans les contenus d'iléon du groupe T (11 phyla) (Annexe 2 : Tableau S1). La comparaison de la composition bactérienne des contenus au niveau du phylum a indiqué que les Firmicutes dominaient tout le long du tube digestif animal (Annexe 2 : Figure S2, S4, S6, S8 et S10) excepté dans le rumen du bovin N°9 du groupe T et des bovins N°44, N°45 et N°51 du groupe A (Figure 16). Dans ces derniers, les Bacteroidetes étaient majoritaires (Figure 16). Les Bacteroidetes représentaient également le second phylum majoritaire dans les contenus digestifs, excepté dans l'iléon dans lequel les Actinobacteria constituaient le second phylum majoritaire (Annexe 2 : Figure S2, S4, S6, S8 et S10). De manière générale, de l'iléon au rectum, l'abondance des Bacteroidetes a augmenté alors que celle des Firmicutes a diminué (Annexe 2 : Figure S12).

Il est toutefois important de souligner une variabilité de la diversité et de l'abondance des différents phyla dans un même contenu prélevé au sein du même groupe de bovins et entre les groupes de bovins. Ces variations ont principalement été observées au niveau des contenus de rumen. Chez les bovins du groupe T, la présence du phylum SHA-109 a uniquement été détectée dans les contenus de rumen de trois animaux (N°15, N°23 et N°24) (Figure 16). Chez les animaux du groupe A, une variabilité de l'abondance de la majorité des phyla représentés a été observée (Figure 16). Par rapport aux animaux du groupe T, le phylum SHA-109 était absent et les Proteobacteria étaient beaucoup plus abondants dans les contenus de rumen des animaux du groupe A (Figure 16).

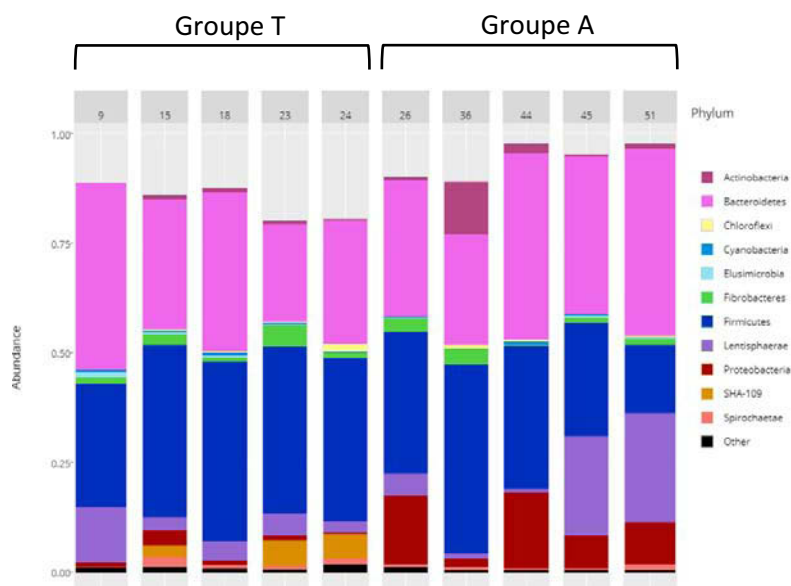
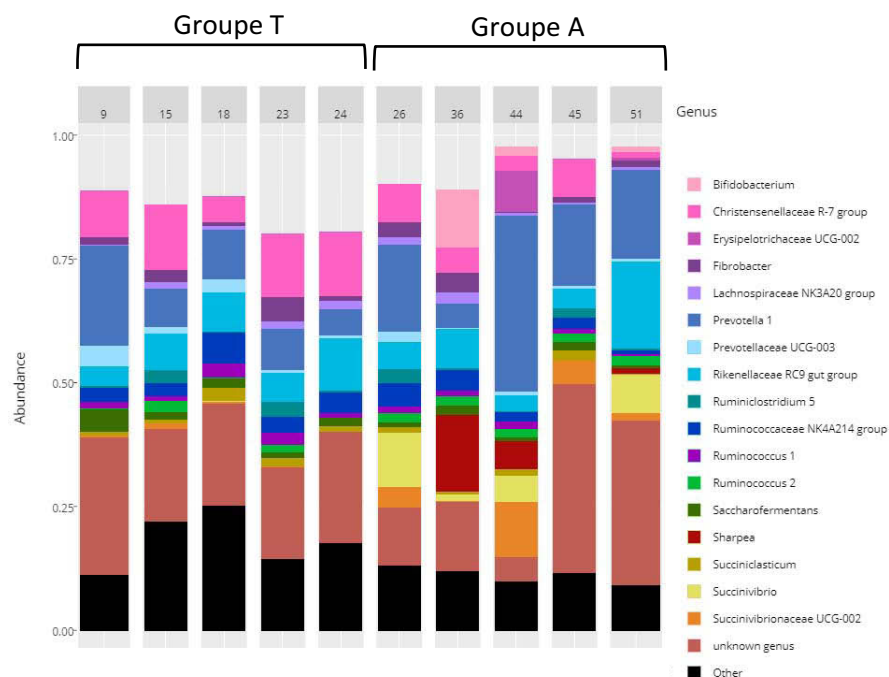


Figure 16 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rumen prélevés le jour de l'euthanasie. Les 11 phyla majeurs ont été représentés

Au niveau des genres, un nombre maximal de 139 et 132 taxa a été identifié dans les contenus de rumen des animaux des groupes A et T, respectivement, et minimal de 59 et 61 genres dans les contenus d'iléon des bovins des groupes A et T, respectivement (Annexe 2 : Tableau S1). Comme pour les phyla, une variabilité importante de l'abondance a été observée parmi les animaux du même groupe mais aussi de groupes différents.

Dans les contenus de rumen de la moitié des bovins, le genre *Prevotella* 1 était dominant et les genres *Bifidobacterium* et *Succinivibrio* étaient majoritairement détectés chez les individus du groupe A (Figure 17). De plus, les genres *Bifidobacterium* et *Sharpea* ont été uniquement détectés dans les contenus de rumen du groupe A. Dans les contenus d'iléon, le genre *Intestinibacter* était majoritaire chez tous les animaux suivi par *Peptoclostridium* (Annexe 2 : Figure S3). Le genre *Bifidobacterium* était plus abondant dans les contenus d'iléon des animaux du groupe A et le genre *Sharpea* a été détecté uniquement chez ces mêmes animaux (Annexe 2 : Figure S3). Comme attendu, la composition en genres bactériens des contenus de caecum, de côlon spiralé, de côlon descendant et de rectum était très similaire avec majoritairement les genres *Intestinibacter*, *Ruminococcaceae* UCG-005, *Bacteroides* et *Peptoclostridium* (Annexe 2 : Figure S5, S7, S9 et S11). Le genre *Bifidobacterium* a été majoritairement détecté chez les bovins du groupe A. Bien que le genre *Sharpea* soit à nouveau détecté dans les contenus de caecum des animaux du groupe A, il était absent dans les contenus postérieurs (Annexe 2 : Figure S5, S7, S9 et S11). De manière général, le long du tube digestif animal (de l'iléon au rectum) l'abondance des *Intestinibacter* et des *Peptoclostridium* a diminué alors que celle des *Bacteroides* et des *Ruminococcaceae* UCG-005 et UCG-010 a augmenté (Annexe 2 : Figure S12).



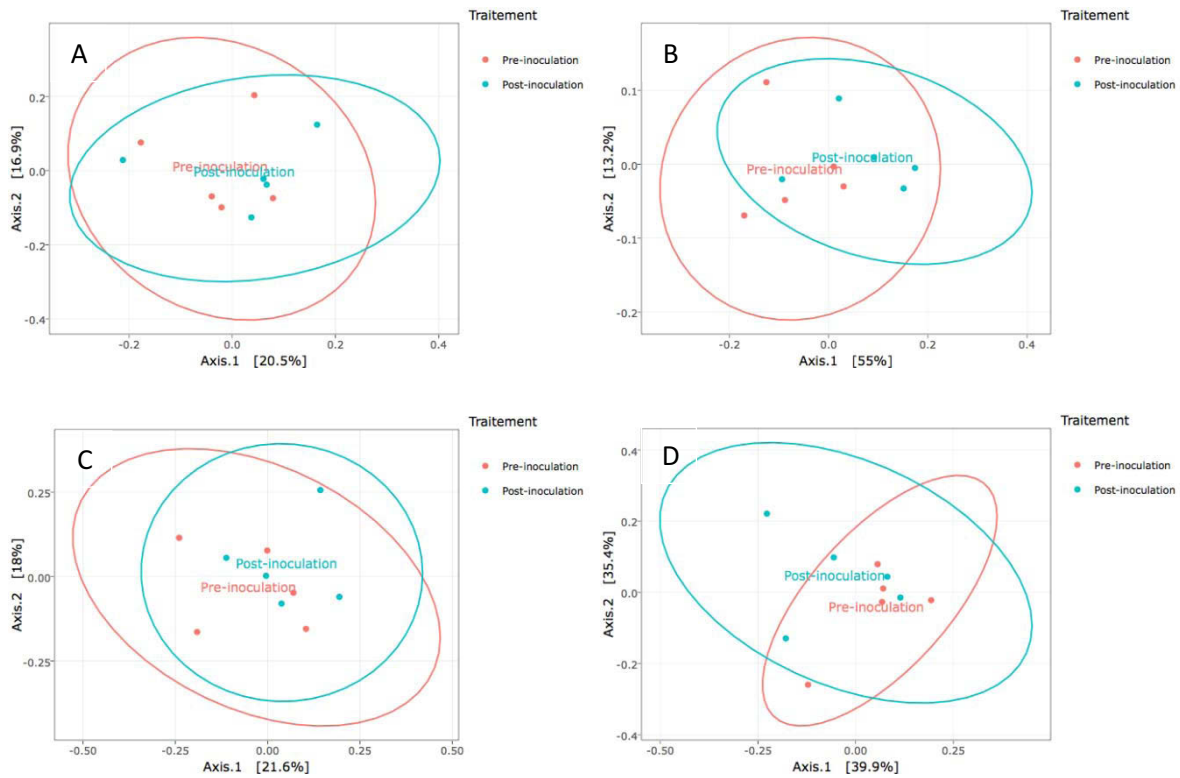
**Figure 17 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rumen prélevés le jour de l'euthanasie.** Les 17 genres majeurs ont été représentés

En raison de la variabilité de la diversité et de l'abondance des communautés bactériennes au sein d'un même groupe de bovins, il est difficile de mettre en évidence si la colonisation de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> a eu un impact sur le microbiote digestif des bovins. Néanmoins, les variabilités observées au sein du groupe A pourraient expliquer les différences d'excrétion et de colonisation de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> observées chez ces animaux.

#### III.4.7.3. Diversité bactérienne des contenus digestifs avant l'inoculation de la souche MC2

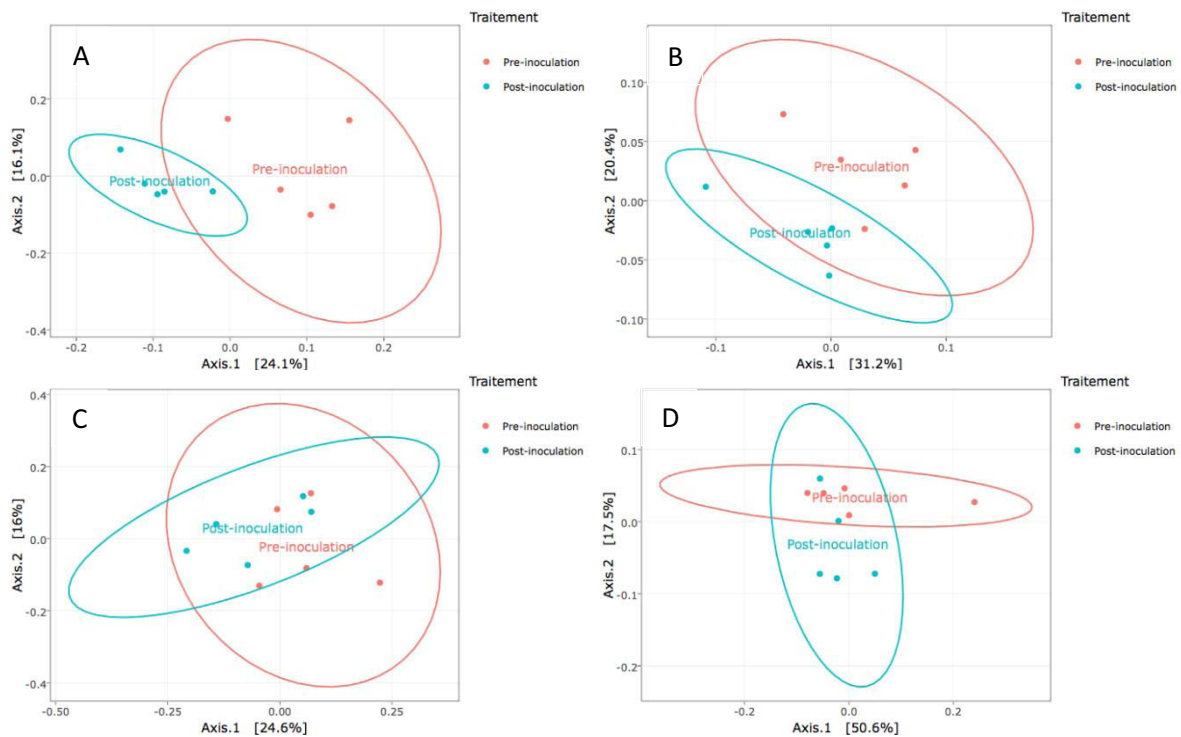
Afin de s'affranchir des variabilités de diversité et d'abondance du microbiote digestif liées à l'individu, la composition des communautés bactériennes des contenus de rumen et de rectum a été étudiée, chez un même animal (groupes A et T), avant l'inoculation des animaux puis le jour de l'euthanasie. Notons que ces prélèvements avant et après inoculation étaient séparés de 29 jours, l'animal était donc âgé d'un mois de plus.

Au niveau des contenus ruminiaux des bovins du groupe T, la PCoA semble indiquer que ni la diversité (Figure 18A) ni l'abondance (Figure 18B) des communautés bactériennes du rumen n'ont été modifiées au cours du temps. La comparaison des phyla et des genres avant l'inoculation de la solution de NaCl et le jour de l'euthanasie a indiqué une variation de l'abondance dans les contenus de rumen au niveau des phyla (Annexe 2 : Figure S13) et des genres (Annexe 2 : Figure S14). Ces variations sont probablement liées à l'âge des animaux qui a évolué entre le moment de l'inoculation et l'euthanasie. Chez les bovins du groupe A, des résultats similaires ont été observés (Figure 18C et D ; Annexe 2 : Figure S13 et S14), suggérant que l'inoculation de la souche MC2 n'a pas impacté de façon durable le microbiote endogène du rumen.



**Figure 18 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des contenus ruminants avant l'inoculation et le jour de l'euthanasie. (A, B) Groupe T ; (C, D) Groupe A (A, C) méthode unweighted Unifrac ; (B, D) méthode weighted Unifrac. Le pourcentage de variation expliqué par PC1 et PC2 est indiqué sur les axes**

Dans les contenus de rectum des bovins du groupe T, la PCoA a indiqué que l'âge des animaux a impacté la diversité (Figure 19A) et l'abondance (Figure 19B) des communautés bactériennes des fèces. La comparaison des phyla et des genres avant l'inoculation de la solution de NaCl et le jour de l'euthanasie a en effet indiqué majoritairement une variation de l'abondance des phyla (Annexe 2 : Figure S15) et des genres (Annexe 2 : Figure S16). Chez les bovins du groupe A, des résultats similaires ont été observés (Figure 19C et D ; Annexe 2 : Figure S15 et S16). Par exemple, dans les contenus de l'animal N°45, une importante diminution de l'abondance des Proteobacteria a été observée (Annexe 2 : Figure S15). Chez ce même animal, le genre *Succinivibrio* n'était plus détecté au moment de l'euthanasie (Annexe 2 : Figure S16).



**Figure 19 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des contenus du rectum avant l'inoculation et le jour de l'euthanasie. (A, B) Groupe T ; (C, D) Groupe A. (A, C) méthode unweighted Unifrac ; (B, D) méthode weighted Unifrac. Le pourcentage de variation expliquée par PC1 et PC2 est indiqué sur les axes.**

Finalement, ces résultats ne permettent pas de déterminer, sans analyses statistiques approfondies, si l'inoculation et la colonisation de la souche MC2 Rif<sup>R</sup> dans le tube digestif des bovins du groupe A a impacté la diversité du microbiote digestif.

#### III.4.7.4. Comparaison des contenus digestifs des groupes A et T

Une analyse en composante principale (PCoA) a également été réalisée sur l'ensemble des 10 animaux des groupes A et T. Lorsque l'ensemble des compartiments digestifs était considéré, la PCoA a permis de différencier trois groupes : les contenus ruminiaux, les contenus iléaux, et l'ensemble des autres contenus intestinaux, de façon comparable aux résultats obtenus séparément sur le groupe A (Figure 15) ou le groupe T (Figure S1). La PCoA réalisée sur l'ensemble des 10 animaux des deux groupes et sur les différents contenus digestifs n'a pas permis de différencier les deux groupes, à aucun niveau du tractus digestif (Résultats non montrés). Là encore, des analyses statistiques complémentaires seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ces premières conclusions préliminaires, et éventuellement identifier les OTU qui seraient significativement différentes entre les deux groupes de bovins.

### III.5. Discussion et conclusion

Au cours de cette étude, nous avons développé le premier modèle d'inoculation expérimentale de STEC O157:H7 chez des jeunes bovins laitiers décrit en France à ce jour. De nombreux travaux de la littérature indiquent que les jeunes bovins excrètent des quantités de souches *E. coli* O157:H7 plus importantes et plus longtemps que les bovins adultes (voir « III.2. Inoculations expérimentales des bovins par des souches d'*E. coli* O157:H7 »). De plus, en France, le portage d'EHEC du top 5 est plus élevé chez les jeunes bovins laitiers (Bibbal *et al.*, 2015). Par ailleurs, nos travaux *in vitro* sur la souche STEC O157:H7 MC2 ont montré, qu'en plus de sa capacité à persister dans l'environnement, la souche était bien adaptée à survivre dans l'écosystème intestinal bovin. L'ensemble de ces éléments a justifié le choix d'utiliser des jeunes bovins laitiers afin d'obtenir un bon modèle de colonisation par la souche STEC O157:H7 MC2. La dose de l'inoculum choisie ( $10^{10}$  bactéries MC2) est toutefois élevée en comparaison avec les quantités retrouvées naturellement dans l'environnement, mais était nécessaire afin d'obtenir des niveaux d'excrétion et de colonisation élevés.

Comme attendu, l'excrétion de la souche MC2 par les bovins était transitoire et des profils d'excrétion similaires ont été observés dans chacun des groupes. Dans les premiers jours post-inoculation, l'excrétion était en effet élevée ( $> 10^4$  bactéries/g de fèces), qualifiant les animaux de super-excréteurs. Cette période de forte excrétion a ensuite été suivie d'une diminution progressive de l'excrétion. L'ensemble des animaux du groupe A a excrété la souche MC2 jusqu'à trois semaines post-inoculation. Ces profils de persistance ont également été observés dans de nombreuses études de la littérature (voir III.2.). Une contamination des cuirs et des oreilles a également été observée le jour de l'autopsie indiquant que l'environnement des bovins était fortement contaminé. Nous avons en effet montré *in vitro* que la souche MC2 était capable de survivre au moins trois semaines dans les matières fécales bovines. Cette survie dans les fèces pourrait donc être à l'origine de la contamination des cuirs.

L'excrétion fécale témoigne de la multiplication et de la colonisation de la souche MC2 dans le tube digestif des bovins. En effet, la souche MC2 a été retrouvée dans tous les contenus digestifs indiquant que les bactéries sont capables de transiter tout le long du tube digestif du bovin. Cependant, la faible détection de la souche MC2 dans les contenus ruminiaux en comparaison avec les autres contenus digestifs indique que les bactéries se sont multipliées dans les compartiments digestifs postérieurs. En effet, de par ses conditions physico-chimiques (pH, acides gras volatiles), le rumen représente un environnement hostile à la croissance des STEC alors que les segments digestifs postérieurs présentent des conditions plus favorables à leur multiplication. Ces résultats sont en adéquation avec ceux que nous avons obtenus *in vitro* avec la souche MC2 mais aussi avec les autres souches *E. coli* O157:H7 testées. La souche MC2 a également été retrouvée dans la cavité buccale au niveau des amygdales probablement dû à la régurgitation au cours de la rumination du contenu ruminal dans lequel la présence de MC2 a été détectée. Par ailleurs, la détection de la souche MC2 au niveau des parois intestinales indique que cette souche est capable de coloniser le tube digestif bovin, notamment l'iléon, le caecum, le côlon et le rectum. Bien que le rectum soit considéré comme le principal site de multiplication et de colonisation des STEC, ce que nous avons également observé pour certains animaux, nos résultats indiquent que l'iléon, le caecum et le côlon constituent également des sites favorables à la multiplication et à la colonisation des STEC. L'absence de MC2 au niveau des nœuds lymphatiques digestifs témoigne d'un cloisonnement de la multiplication et de la colonisation de la souche à la niche intestinale et de l'absence de translocation par voie lymphatique, contrairement à ce que laissaient supposer certains travaux (Cray & Moon, 1995).

La comparaison des niveaux de population de la souche MC2 obtenus dans les groupes A et B, que ce soit dans les contenus digestifs ou sur les parois, pourrait suggérer que la double inoculation a permis une meilleure colonisation que l'inoculation d'une dose unique. Ce résultat nécessiterait à être confirmé avec un plus grand nombre d'animaux. A la ferme, les animaux subissent très certainement des inoculations répétées, même si l'inoculation peut être intermittente. Par conséquent, la double inoculation pourrait être proposée pour une inoculation expérimentale ultérieure.

L'excrétion fécale et la présence de la souche MC2 au niveau des contenus digestifs et des parois digestives étaient très variables entre les différents individus. Puisque les animaux sont issus du même élevage, ont le même âge et ont reçu la même alimentation, il est raisonnable de suggérer que cette variabilité entre les animaux pourrait être attribuée à la composition et à la structure du microbiote endogène. L'analyse du microbiote digestif adhérent aux parois digestives n'a pas pu être réalisée en raison du faible nombre de « reads » obtenus suite au séquençage de l'ADNr 16S bactérien. Les ADN extraits des biopsies des parois digestives ont en effet présenté un grand nombre de séquences eucaryotes provenant des cellules de l'hôte. Ce résultat suggère que les méthodes utilisées devront être optimisées en vue d'éliminer les ADN eucaryotes contaminants si cette expérimentation devait être répétée. Le séquençage de l'ADNr 16S des bactéries totales des contenus digestifs a révélé d'une part que la composition au niveau des phyla et la diversité des espèces bactériennes était similaire à celles observées dans la littérature, et d'autre part que l'abondance de ces espèces bactériennes variait entre les animaux quel que soit le groupe (témoin ou inoculé), également en accord avec la littérature. Cette variabilité de l'abondance pourrait expliquer les différences de colonisation et d'excrétion de MC2 observées chez les bovins. Mais il est difficile de mettre en évidence un changement de la diversité suite à la colonisation de la souche MC2. L'hébergement des animaux témoins et des animaux inoculés étaient différents et l'environnement pourrait être responsable, en partie, de la variabilité observée entre les animaux de groupes différents. Des analyses statistiques sont en cours afin de mettre en évidence un potentiel impact de la colonisation de la souche MC2 sur le microbiote endogène. Il est toutefois important de souligner qu'un plus grand nombre d'animaux témoins et inoculés dans les mêmes conditions faciliterait l'interprétation des résultats.

Malgré une multiplication et une colonisation importante de la souche MC2 dans l'intestin du bovin, l'absence de signe clinique confirme le portage asymptomatique des bovins par des souches STEC O157:H7. Les épisodes d'hyperthermie observés ne semblent pas en lien avec l'inoculation de la souche MC2 puisque les bovins du groupe B ont présenté ces symptômes avant leur arrivée dans l'animalerie A3. Le stress lié au transport pourrait expliquer les symptômes observés chez ces animaux. Cependant, l'inoculation de la souche MC2 a engendré (i) des anomalies microscopiques de l'épithélium de l'iléon et du rectum avec infiltration d'éosinophiles et (ii) une réponse inflammatoire locale caractérisée par une production importante de cytokines pro-inflammatoires, notamment chez les animaux ayant reçu deux inoculations. Des anomalies de l'épithélium rectal ont également été observées après l'inoculation d'une souche EHEC O157:H7 ( $10^9$  bactéries) chez des jeunes bovins (Nart *et al.*, 2008). L'infiltration d'éosinophiles au niveau de l'épithélium intestinal de l'intestin et du rectum a aussi été rapportée (Pohlentz *et al.*, 2004; Woodward *et al.*, 1999). La réponse pro-inflammatoire induite pourrait expliquer la diminution du niveau de l'excrétion. Toutefois, la présence de la souche MC2 était plus importante au niveau des contenus et des parois des animaux inoculés deux fois, suggérant que la réponse inflammatoire n'a pas empêché la multiplication et la colonisation de la souche MC2. Ces éléments tendent à suggérer que les STEC O157:H7 ne se comporteraient pas comme des *E. coli* commensaux du tube digestif bovin.



En conclusion, ce modèle pourra être utilisé pour tester *in vivo* l'effet d'additifs alimentaires, tels que les probiotiques, afin de réduire le portage et l'excrétion de souches STEC O157:H7 par les bovins. Ce modèle reproductible d'inoculation expérimentale de STEC O157:H7 constitue ainsi un moyen efficace pour tester de nouvelles stratégies pré-abattages de réduction du risque de contamination des produits de la chaîne alimentaire de l'Homme, avant la mise en place d'essais grandeur nature.



## DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Les EHEC sont devenus en une vingtaine d'année un problème majeur de santé publique, présentant un impact important pour l'Homme et les industries agro-alimentaires. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, ces pathogènes émergents sont responsables chez l'Homme de diarrhées hémorragiques pouvant évoluer vers des atteintes systémiques graves tels que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) principalement chez le jeune enfant. Rappelons qu'en 2016, en France, 113 cas de SHU ont été notifiés chez les enfants de moins de 15 ans, principalement dus aux souches EHEC de sérogroupes O26, O80 et O157 (Bruyand *et al.*, 2016). Les EHEC de sérotype O157:H7 restent prédominants dans les épidémies et les cas pathologiques sévères en France et en Europe (ANSES, 2017a). En France, sept épidémies d'origine alimentaire sont survenues entre les années 2005 et 2016 et trois d'entre elles étaient liées à la consommation de viande de bœuf contaminée par des EHEC de sérotype O157:H7. Limiter l'excrétion fécale des *E. coli* O157:H7 par les animaux porteurs est donc une cible prioritaire pour limiter leur propagation dans la chaîne alimentaire de l'Homme et éviter ainsi les infections humaines. En effet, aucune thérapie efficace n'existe à ce jour chez l'Homme. Réduire le portage animal est donc une stratégie de choix pour réduire les toxi-infections humaines à EHEC, éviter les situations épidémiques et les crises qui peuvent en résulter dans les filières de production concernées. Les travaux conduits au cours de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte et avaient pour but d'apporter des connaissances sur la génomique des STEC/EHEC, en particulier du sérotype O157:H7, et leur physiologie dans le tube digestif du bovin. En effet, en vue de proposer de nouvelles stratégies de lutte contre le portage des STEC par les ruminants, des études concernant la diversité génétique et la génomique des souches sont nécessaires, de même que des études de leur physiologie dans et hors le tube digestif de l'animal, ainsi que l'étude de leur interaction avec le microbiote commensal.

#### 1. Diversité génétique des souches STEC et EHEC O157:H7, facteurs de virulence et de fitness

Les bovins sont porteurs sains de nombreuses souches STEC de sérotype O157:H7, dont certaines sont pathogènes pour l'Homme, suggérant des différences de capacité des souches *E. coli* O157:H7 à engendrer la maladie chez l'Homme. De multiples méthodes de typage ont en effet permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité génétique parmi les souches STEC O157:H7. De plus, des analyses génomiques ont démontré que les *E. coli* O157:H7 divergeaient en trois lineages (I, I/II et II) en fonction d'un polymorphisme de longueur de séquence à six *loci* distincts dans le génome des souches *E. coli* O157:H7 (Yang *et al.*, 2004). Alors que les *E. coli* O157:H7 des lineages I et I/II sont principalement des souches cliniques, les souches de lineage II ont majoritairement été isolées de l'hôte bovin. Les souches de lineage II sont considérées comme ayant des propriétés de pathogénicité et de transmission chez l'Homme différentes des souches appartenant aux lineages I et I/II (Baker *et al.*, 1997; Leopold *et al.*, 2009). En effet, des marqueurs génétiques associés à une virulence altérée ont été identifiés chez des souches STEC O157:H7 d'origine bovine (Eppinger *et al.*, 2011). Par ailleurs, la présence des variants Stx2a et Stx2c est fréquemment retrouvée chez les souches cliniques, alors que Stx1 est fréquent chez les souches d'origine bovine. Ainsi, le séquençage massif et la comparaison génomique de souches *E. coli* O157:H7 bovines et humaines permettraient de mettre en évidence des signatures génomiques spécifiques permettant de différencier ces souches au niveau de leur potentiel de virulence et de leur physiologie. Cette différenciation représente un enjeu majeur pour les services de santé publique afin d'identifier chez l'animal des

souches particulièrement à risque chez l'Homme et de cibler celles-ci chez l'animal grâce à des stratégies telles que la vaccination. Au cours de ce travail de thèse, nous avons séquencé et caractérisé le génome de la souche STEC O157:H7 MC2 d'origine bovine et persistante en élevage et de la souche *E. coli* commensale BG1 d'origine bovine. Puisque peu de données de la littérature au niveau génomique ne concernent les souches *E. coli* commensales d'origine bovine, le génome de BG1 peut être, à ce jour, utilisé comme génome de référence pour des analyses comparatives avec des souches *E. coli* cliniques et commensales d'origine bovine et humaine. Le séquençage et la caractérisation du génome de la souche MC2 nous a permis de classer cette souche comme étroitement liée aux souches O157:H7 cliniques et de la considérer comme potentiellement pathogène pour l'Homme puisqu'elle possède toutes les caractéristiques phénotypiques et génomiques des EHEC typiques majeurs. Les structures bactériennes ou stratégies qui contribuent au potentiel d'infection d'un pathogène chez un hôte sont classiquement appelés facteurs de virulence. Ces structures et stratégies incluent celles qui favorisent la colonisation et la survie et celles qui induisent des dommages à l'hôte (Hill, 2012). Cependant, certains de ces facteurs sont également partagés par des organismes commensaux. En effet, les souches MC2 et BG1 possèdent, d'après la banque de données VFDB (« virulence factor database »), de nombreux « facteurs de virulence » (283 chez MC2 contre 164 chez BG1). Chez BG1, ces facteurs de virulence sont principalement impliqués dans l'adhésion, la captation du fer et la synthèse de flagelle. Nous avons identifié 14 et 12 systèmes d'adhésion chez MC2 et BG1, respectivement, dont 9 sont partagés par les deux souches. La souche MC2 possède également des systèmes de captation du fer supplémentaires par rapport à la souche BG1. Ainsi, de « vrais » facteurs de virulence devraient être définis comme des structures ou stratégies conduisant à l'apparition de symptômes chez l'hôte et qui définissent un pathogène, alors que les facteurs de fitness constituent des structures et stratégies favorisant la mobilité, l'évasion du système immunitaire, la nutrition, l'adhésion ainsi que de nombreuses stratégies de colonisation et de communication bactériennes dans un environnement donné. Le séquençage d'un très grand nombre de génomes de souches STEC, EHEC et de souches *E. coli* commensales devrait permettre à terme de mieux identifier les facteurs qui contribuent à ce qu'une souche STEC devienne une EHEC pathogène.

## 2. Métabolisme des EHEC dans le tube digestif du bovin

Dans l'environnement intestinal du bovin, les processus favorisant la survie et la colonisation des EHEC sont peu connus. Nous avons montré *in vitro* que plusieurs souches EHEC O157:H7 (EDL933, Sakai), STEC O157:H7 (MC2, NV95) et *E. coli* commensale bovine (BG1) sont capables de survivre dans les contenus du tube digestif animal et de se multiplier dans les contenus des compartiments postérieurs (intestin grêle, caecum, côlon et rectum). *In vivo*, le modèle d'inoculation expérimentale de bovins par la souche MC2 développé au cours de ce travail de thèse a confirmé les résultats obtenus *in vitro* et a permis de montrer que les *E. coli* O157:H7 sont également capables d'adhérer à l'épithélium intestinal, notamment des segments digestifs postérieurs. Les *E. coli* O157:H7 sont ainsi retrouvés dans l'ensemble du tube digestif du bovin et ces études menées *in vitro* et *in vivo* sont en accord avec les données de la littérature obtenues chez des animaux naturellement et expérimentalement inoculés par des souches *E. coli* O157:H7. Bien qu'*in vitro*, les différentes souches que nous avons testées présentent des profils de survie similaire, les données de la littérature indiquent que l'origine d'une souche (humaine, animale ou environnementale) affecte le profil

d'excrétion dans les fèces chez des animaux expérimentalement inoculés, suggérant que les processus de colonisation de ces souches sont différents (Gautam *et al.*, 2012). Afin de mettre en évidence ces processus, nous avons étudié le transcriptome de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 incubée dans trois contenus digestifs, le rumen, l'intestin grêle et le rectum, par RNA-Seq. Nous avons mis en évidence l'activation de nombreuses voies métaboliques communes par les EHEC lors de l'incubation dans les trois contenus digestifs, suggérant la présence des mêmes nutriments dans l'ensemble du tube digestif bovin. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire avaient mis en évidence l'utilisation par les EHEC de voies métaboliques spécifiques leur conférant un avantage de croissance dans l'intestin grêle du bovin. Il s'agit des voies de dégradation de l'éthanolamine (EA), des sucres du mucus et des substrats de la néoglucogénèse (Bertin *et al.*, 2013a; Bertin *et al.*, 2014; Bertin *et al.*, 2011). Les résultats obtenus par RNA-Seq suggèrent que l'EA, certains sucres du mucus et substrats de la néoglucogénèse représentent également des nutriments disponibles pour les EHEC dans les contenus de rumen et de rectum. Cependant, l'activation de certaines voies métaboliques a été observée uniquement en contenus de rectum. Le rectum étant considéré comme le site de colonisation et de multiplication préférentiel des EHEC, l'activation de ces voies métaboliques pourraient contribuer à leur prolifération à ce site. Cette étude transcriptomique de la souche EHEC O157:H7 EDL933 incubée dans des conditions physiologiques proches de celles rencontrées dans le tube digestif de l'animal a donné accès à des pistes supplémentaires de travail afin de mieux connaître la physiologie des EHEC dans le tube digestif bovin et de trouver des stratégies nutritionnelles pour limiter le portage des EHEC chez le bovin. Puisque les résultats obtenus par RNA-Seq suggèrent que l'EA et l'aspartate représentent des nutriments disponibles dans les trois compartiments digestifs bovins testés, ils pourraient constituer des cibles intéressantes. En effet, l'EA confère un avantage de croissance aux EHEC dans l'intestin grêle bovin et les bactéries du microbiote endogène, dont les *E. coli* commensaux, sont incapables de dégrader cette molécule. Chez la souche BG1, la présence d'une insertion de 72 pb, correspondant à 24 acides aminés, a été observée dans le gène *eutT*. Ceci pourrait expliquer l'incapacité de la souche BG1 à utiliser l'EA. Des résultats non publiés du laboratoire indiquent que l'aspartate confère également un avantage nutritionnel de croissance aux EHEC et que cet acide aminé est utilisé plus efficacement par les EHEC que par les *E. coli* commensaux. Ainsi, l'EA et l'aspartate représentent deux cibles intéressantes pour limiter le portage des EHEC chez le bovin, par exemple via la distribution aux animaux de probiotiques qui utiliseraient de manière efficace ces deux nutriments. Pour se maintenir dans l'intestin, les EHEC doivent disposer de sources de nutriments, mais d'autres facteurs de colonisation sont nécessaires à la persistance des EHEC dans l'écosystème intestinal, tels que des facteurs d'adhésion, des facteurs de virulence et des systèmes de résistance au stress. L'analyse transcriptomique de la souche EDL933 n'a pas permis de mettre en évidence l'activation de facteurs d'adhésion connus qui pourraient contribuer à la colonisation des EHEC à la surface de l'épithélium intestinal. Cette analyse confirme néanmoins que le rumen n'est pas un site de colonisation contrairement aux autres compartiments digestifs puisque c'est dans l'intestin grêle et le rectum que la synthèse de flagelles est importante. Ces structures permettent d'établir le contact initial des bactéries aux entérocytes. Dans le rectum, certains facteurs de virulence sont induits, tels que le Ler, un activateur transcriptionnel du LEE qui représente un facteur d'adhésion indispensable à la colonisation. Dans les contenus digestifs, la mise en place de nombreux systèmes de résistance au stress a été observée, et plus particulièrement de systèmes toxine/anti-toxine (TA) dans le rumen. Dans le rumen, les conditions ne sont pas favorables à la croissance des EHEC et d'après les résultats du RNA-Seq, le métabolisme des EHEC semble réduit en comparaison avec les autres contenus digestifs. Certains systèmes TA sont capables d'inhiber le

métabolisme bactérien. Ainsi, les systèmes TA pourraient contribuer à l'inhibition de la croissance observée *in vitro* dans le rumen en réduisant par exemple le métabolisme bactérien. Les systèmes TA sont induits en réponse à de multiples stress et leur régulation, au niveau transcriptionnel et traductionnel, est extrêmement complexe. De ce fait, les systèmes TA pourraient permettre la sélection de souches hautement résistantes qui pourront efficacement transiter et coloniser les compartiments digestifs postérieurs. Une fois excrétées dans les fèces, ces bactéries seront bien adaptées à persister dans l'environnement et pourront infecter de manière efficace un nouvel hôte. Cette étude transcriptomique *in vitro* présente toutefois des limites : (i) l'absence de cellules épithéliales et de matrice extracellulaire recouvrant les entérocytes et (ii) l'absence du microbiote endogène dans les contenus digestifs. En effet, l'épithélium intestinal représente une source de nutriments constamment renouvelable pour les EHEC assurant leur nutrition. Le microbiote intestinal peut également constituer une source de nutriments grâce à la lyse des membranes bactériennes dont les composants sont relargués dans la lumière intestinale. De plus, il existe une forte compétition pour les nutriments présents dans l'écosystème digestif entre les EHEC et le microbiote intestinal. Par ailleurs, certains facteurs d'adhésion comme l'AST3 sont activés une fois les bactéries proches de l'épithélium intestinal et peuvent reconnaître des récepteurs spécifiques. L'absence de l'épithélium intestinal peut expliquer que cette étude transcriptomique ne permette pas d'identifier les facteurs impliqués dans l'adhésion tels que les fimbriae, les pili, les curli, l'intimine et son récepteur Tir, et dans la virulence, tels que l'AST3 et les Shiga-toxines. Il serait alors nécessaire de réaliser cette étude *in vivo*. Des essais ont été menés dans le cadre du modèle d'inoculation expérimentale de bovins par la souche MC2. A l'autopsie, les contenus digestifs d'intestin grêle et de rectum ont été prélevés et la souche MC2 a été enrichie à l'aide de billes magnétiques présentant à leur surface des anticorps anti-O157. Les ARN ont été extraits mais la faible concentration obtenue ne nous a pas permis de quantifier l'expression de gènes d'intérêt par RT-qPCR. Enfin, puisque des différences dans l'utilisation de glucides ont été précédemment mises en évidence entre des souches EHEC et *E. coli* commensales dans un modèle de souris traitée à la streptomycine (Fabich *et al.*, 2008), il serait intéressant de comparer le transcriptome de la souche MC2 à celui de la souche EDL933. En parallèle du transcriptome de la souche EDL933, nous avons obtenu par RNA-Seq le transcriptome de la souche MC2 incubée en contenus de rectum dans les mêmes conditions que la souche EDL933 (Résultats non présentés). La comparaison du transcriptome des deux souches a révélé des différences au niveau des voies métaboliques activées. Par exemple, la souche MC2 semble utiliser plus efficacement un des sucres du mucus, le N-acétylgalactosamine, que la souche EDL933. Il s'agit toutefois d'une analyse préliminaire qui doit être approfondie. Enfin, il serait également intéressant de réaliser l'analyse du protéome de la souche EDL933 incubée dans les mêmes conditions. Ainsi, les voies métaboliques que nous avons identifiées comme sur-exprimées dans les contenus digestifs devraient être confirmées par quantification protéomique. En effet, certains travaux ont montré qu'il n'y a pas forcément de corrélation entre le transcriptome et le protéome bactérien, puisque différentes régulations post-transcriptionnelles peuvent exister et influencer sur la quantité de protéines produites, et donc sur l'activité des enzymes (Borirak *et al.*, 2015; Taniguchi *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'importance de certaines voies métaboliques pour la multiplication des EHEC dans le tube digestif animal pourrait également être confirmée par des études de compétition pour la croissance en contenus digestifs entre souches sauvage et mutante dans la voie d'intérêt, comme réalisé précédemment au laboratoire en contenu intestinal (Bertin *et al.*, 2013a; Bertin *et al.*, 2011).



### 3. Interaction STEC/EHEC et microbiote commensal

Dans le cadre de la caractérisation phénotypique de la souche MC2, le taux de croissance de la souche incubée dans les fèces filtrées était significativement plus important que celui observé dans les fèces en présence du microbiote endogène. Ce phénomène a également été observé lors de l'incubation dans les contenus digestifs et des résultats similaires ont parfois été obtenus avec la souche EDL933 (Résultats non montrés). Ces résultats suggèrent une compétition nutritionnelle entre le microbiote endogène et les souches *E. coli* O157:H7. Notons que cette différence du taux de croissance avec ou sans microbiote n'a pas été observée lors de l'étude du transcriptome de la souche EDL933. En fait, au cours de nos différentes expérimentations, nous avons observé une variabilité dans la croissance des souches en présence du microbiote. Il semble que ces différences étaient dues au microbiote lui-même, ou aux animaux d'origine de ce microbiote. Ces différences observées pourraient provenir de variations dans le régime alimentaire ou l'âge des animaux, par exemple. Nous avons également observé des différences de croissance des souches selon que le microbiote venait d'être prélevé (état frais) ou avait été préalablement congelé à -80°C. Ces résultats suggèrent que la composition ou la viabilité du microbiote endogène impacte les paramètres de croissance des STEC/EHEC. Les données de la bibliographie ont par ailleurs montré que l'augmentation de la diversité bactérienne du tractus digestif du bovin avec l'âge conduisait à une diminution de la prévalence et de l'excrétion des STEC (Zhao *et al.*, 2013), ce qui va dans le sens de nos observations. De plus, l'inoculation expérimentale par la souche MC2 a révélé que des bovins de même âge, de même alimentation et de même élevage présentaient des profils de colonisation et d'excrétion de la souche MC2 différents suggérant que le microbiote digestif a probablement un impact sur la colonisation et l'excrétion des EHEC. Le séquençage de l'ADNr 16S bactérien réalisé à partir de contenus digestifs prélevés dans le cadre de l'expérimentation animale a en effet révélé une variation individuelle du microbiote digestif chez les animaux inoculés qui pourrait expliquer les différents profils de colonisation et d'excrétion de la souche MC2. Cette analyse n'a cependant pas permis de montrer que l'inoculation de la souche MC2 impactait la structure et la composition du microbiote endogène. En effet, la variation individuelle du microbiote intestinal chez les animaux témoins et les animaux inoculés par la souche MC2, et le faible nombre d'animaux utilisés (n=5 dans chaque groupe) rendent cette approche difficile. Certaines différences ont été observées au niveau des phyla ou des genres bactériens entre les groupes A et T, mais nous ne pouvons pas affirmer que ces différences étaient uniquement dues à l'inoculation de la souche MC2. Nous avons également réalisé le séquençage de l'ADNr 16S des archées et 18S des eucaryotes dans les contenus digestifs des animaux inoculés et des animaux témoins (analyse en cours). Cette analyse nous permettra peut-être de mettre en évidence des différences expliquant les profils variables de colonisation et d'excrétion des animaux inoculés mais également un potentiel impact de la colonisation de la souche sur le microbiote digestif. A l'avenir, les études d'interaction entre STEC/EHEC et microbiote digestif bovin devront être poursuivies et approfondies. En effet, de telles études permettraient peut-être d'identifier des genres bactériens du microbiote commensal favorisant ou au contraire limitant la colonisation et la multiplication des STEC dans le tube digestif animal. Ces genres « inhibiteurs » pourraient être de bons candidats pour tester leur utilisation en tant qu'additif alimentaire pour réduire l'excrétion fécale des STEC par les ruminants.

#### 4. Persistance des STEC dans l'environnement

Une fois excrétés dans les fèces hors du tube digestif de l'animal, les EHEC doivent résister aux conditions hostiles rencontrées dans l'environnement. De nombreux travaux de la littérature indiquent que les EHEC sont capables de résister de longues périodes dans l'environnement de l'élevage, particulièrement à de faibles températures, suggérant qu'elles sont bien équipées pour résister aux stress rencontrés. La souche MC2 persistante en élevage a été sélectionnée afin d'étudier les facteurs lui permettant de résister aux stress rencontrés dans l'environnement. Afin de mimer l'excrétion des EHEC dans les matières fécales, la souche MC2 a été inoculée dans des fèces prélevées dans le rectum de bovins et incubées à 15°C. Les souches MC2, EDL933 et BG1 sont capables de persister au moins plusieurs semaines dans ces conditions *in vitro* et semblent mettre en place des systèmes différents de résistance aux stress. Par exemple, la souche MC2 semble activer certains systèmes TA, contrairement aux souches EDL933 et BG1. Les systèmes TA semblent donc jouer un rôle important, non seulement pour la survie des STEC dans le rumen des animaux, mais aussi pour leur survie et persistance dans les fèces à basse température. Ces systèmes devront être étudiés plus en détail afin de mettre en évidence leur rôle spécifique dans la physiologie et le fitness des souches O157:H7 dans et hors le tube digestif animal. Cependant, les matières fécales ne constituent pas la seule source de transmission et de recontamination des animaux. La capacité de la souche MC2 à former des biofilms suggère qu'elle peut coloniser des surfaces abiotiques contaminées par des fèces. Pour mieux comprendre la persistance d'une souche, il serait intéressant de comparer le transcriptome de cette souche incubée dans des environnements variés tels que les fèces animales, la surface des végétaux ou le sol, et au cours de la formation de biofilms.

#### 5. Utilisation de nouveaux probiotiques pour réduire le portage des STEC chez les ruminants

Les bovins jouent un rôle important dans l'épidémiologie des infections humaines à EHEC. Ces pathogènes sont bien adaptés à survivre dans l'écosystème intestinal et à persister dans l'environnement favorisant le risque de recontamination des animaux et par conséquent d'infections humaines. Il est donc crucial de développer des stratégies pour réduire la survie des EHEC dans le tube digestif du bovin. Ces stratégies incluent, entre autres, l'utilisation de souches probiotiques. Différentes études ont montré l'efficacité de la distribution de certains probiotiques pour réduire l'excrétion fécale de STEC (voir Synthèse bibliographique, paragraphe III.4.3), dont en particulier des bactéries lactiques. Cependant, les probiotiques ne sont pas, pour le moment, utilisés à de telles fins (qualités sanitaires), mais plutôt pour des objectifs zootechniques (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010a). Les *Lactobacillus* sont connus pour leur effet inhibiteur sur de nombreux pathogènes intestinaux et sont couramment utilisés comme probiotique chez l'Homme et l'animal. L'activité antimicrobienne des *Lactobacillus* est due à la production de métabolites tels que l'acide lactique ou des bactériocines. *Lactobacillus reuteri* est un probiotique commercialisé possédant des propriétés antimicrobiennes contre les pathogènes intestinaux. Ces bactéries produisent un composé antimicrobien, l'hydroxypropionaldéhyde (HPA ou reutéline) au cours de la fermentation anaérobie du glycérol. De plus, les molécules d'HPA sont produites par *L. reuteri* en grande quantité lorsque la disponibilité en glucides est faible. Au cours de ce travail de thèse, j'ai participé à une étude qui a consisté à tester la production d'HPA par la souche *L. reuteri* LB1-7 et son activité antimicrobienne

contre la souche EHEC O157:H7 FCH6 en contenus de rumen bovins. *L. reuteri* est capable d'éliminer complètement la souche EHEC FCH6 au cours de l'incubation en contenus de rumen et en présence de 80 mM de glycérol. Cet effet est dû à la production d'HPA. Bien que le rumen ne soit pas considéré comme un site de colonisation, il représente un compartiment digestif cible pour diminuer le portage des EHEC puisque (i) il permet la sélection de souches hautement résistantes et (ii) le processus de régurgitation des ruminants conduit à la contamination de l'environnement par les EHEC et à la recontamination d'autres animaux. Par ailleurs, les EHEC incubés en contenus de rumen en présence de *L. reuteri* LB1-7 et de glycérol présentent une inhibition de croissance dans les contenus de rectum, suggérant qu'en ciblant les EHEC dans le rumen, *L. reuteri* peut diminuer la colonisation des EHEC dans les compartiments postérieurs. Cependant, l'activité de *L. reuteri* présente également un effet antimicrobien sur le microbiote endogène du rumen pouvant ainsi impacter la fonction digestive de ce compartiment. Le modèle d'inoculation expérimentale de jeunes bovins par la souche MC2 mis au point permettra de tester la souche *L. reuteri* et la complémentation en glycérol et de confirmer son impact sur les EHEC *in vivo*. Ce modèle animal d'inoculation expérimentale pourra également servir pour tester d'autres souches bactériennes compétitrices. Par exemple, nous avons déjà évoqué ci-dessus l'utilisation de souches utilisant très efficacement l'EA ou l'acide aspartique. Nous avons ainsi identifié une espèce bactérienne isolée chez le porc, *Cloacibacillus porcorum*, capable d'utiliser l'EA et présente également dans le rumen (S. Denman, communication personnelle), qui pourrait être testée d'abord *in vitro*, puis si efficace *in vitro*, administrée dans le modèle animal afin d'en confirmer l'intérêt.

L'objectif final est de proposer aux professionnels de la filière bovine des alternatives pour maîtriser en amont les qualités sanitaires des produits. Ces stratégies s'ajouteront ainsi en amont des mesures de maîtrise prises au stade de l'abattage, de la découpe et de la transformation des viandes. Réduire le portage animal des EHEC représente donc une stratégie de choix pour limiter les toxi-infections humaines à EHEC et les crises économiques qui peuvent en résulter dans les filières de production concernées.



## VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE



## Publications, communications orales et affichées

### PUBLICATIONS

Publication 1 : Manuscrit en préparation

Segura A, Bertoni M, Auffret P, Klopp C, Bouchez D, Genthon C, Durand A, Bertin Y, Forano E. Transcriptomic analysis reveals specific expression of metabolic pathways of the enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strain EDL933 in bovine intestinal contents.

Publication 2 publiée dans *Genome Announcements*

Auffret P\*, Segura A\*, Bertin Y, Klopp C, Bouchez O, Kérouredan M, Bibbal D, Brugère H, Forano E. Draft genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain MC2 isolated from cattle in France. 05 octobre 2017. doi: 10.1128/genomeA.01097-17. \*: co-premier auteur

Publication 3 publiée dans *Frontiers in Microbiology*

Segura A, Auffret P, Bibbal D, Bertoni M, Durand A, Jubelin G, Kerouredan M, Brugère H, Bertin Y, Forano E. Factors involved in the persistence of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content. 09 mars 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00375

Publication 4 publiée dans *Standards in Genomic Sciences*

Segura A, Auffret P, Klopp C, Bertin Y, Forano E. Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* strain BG1 isolated from bovine gastro-intestinal tract. 10 octobre 2017. doi: 10.1186/s40793-017-0272-0

### COMMUNICATIONS ORALES

Segura A, Bertin Y, Durand A, Auffret P, Bertoni M, Forano E. Analyse transcriptionnelle des *E. coli* entérohémorragiques en contenus digestifs bovins.

- 14<sup>ème</sup> rencontre des microbiologistes du pôle clermontois. Clermont Ferrand. Avril 2017.
- 20<sup>ème</sup> journée de l'École Doctorale SVSAE. Clermont Ferrand. Mai 2017.

### AFFICHES

Segura A, Bertin Y, Durand A, Auffret P, Bertoni M, Forano E. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in bovine digestive contents and interaction with the animal endogenous microbiota. The 10<sup>th</sup> international INRA-Rowett Symposium of Gut Microbiology: 20 years & counting. Clermont Ferrand, France. Juin 2016

Segura A, Bertoni M, Auffret P, Klopp C, Bertin Y, Durand A, Forano E. Transcriptomic analysis of the reference EHEC O157:H7 strain EDL933 in bovine intestinal contents reveals specific metabolic pathways. The 10<sup>th</sup> international Symposium VTEC. Florence, Italy. Mai 2018

## AUTRES PARTICIPATIONS

### Publication publiée dans Plos One (ANNEXE 3)

Bertin Y, Habouzit C, Dunière L, Laurier M, Durand A, Duchez D, Segura A, Thévenot-Sergentet D, Baruzzi F, Chaucheyras-Durand F, Forano E. *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety?. 01 novembre 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0187229

### Communications orale et affichée

Bertin Y, Habouzit C, Laurier M, Durand A, Duchez D, Segura A, Thévenot-Sergentet D, Baruzzi F, Chaucheyras-Durand F, Forano E. *Lactobacillus reuteri* suppresses enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid.

- The 10<sup>th</sup> international INRA-Rowett Symposium of Gut Microbiology: 20 years & counting. Clermont Ferrand, France. Juin 2016. [Affiche]
- The 6<sup>th</sup> Beneficial Microbes Conference, Amsterdam, the Netherlands. Octobre 2017. [Oral]



## ANNEXES



## ANNEXE 1

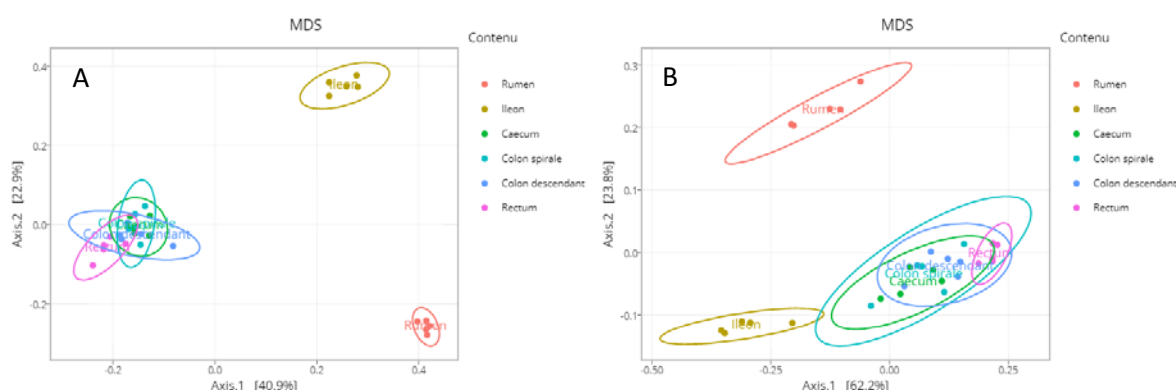
**Tableau S1 : Liste des couples d'amorces utilisés dans l'analyse complémentaire du RNA-Seq (Chapitre I)**

N° du gène	Gène	Séquence Forward (5'-3')	Sequence Reverse (5'-3')	Référence
Z5730	<i>ghoS</i>	GGAAGGTAAAAACAAGTTC	CGATGTCGTTATTGCGAAG	Cette étude
Z5731	<i>ghoT</i>	GGCACTATTCTCTAAAAT	AAGTAATGCCACAGGCAGAC	Cette étude
NA	<i>hicA</i>	AAAGCGAGTTCAGACGTTGG	CCGAGTTGTTTCAGGATTGC	Cette étude
Z2281	<i>hicB</i>	GGATATCCCTGAAGCGTTGA	GCGACGCTCAAAGGTACTION	Cette étude
Z4481	<i>prfF</i>	GCCTGGTGGGCAAGTATTTA	GCCAGCGACAAGTTTCTTTC	Cette étude
Z4482	<i>yhaV</i>	CACGGTCAATCCATCATCAC	TCGTTTCATCCATCCAGAAT	Cette étude

NA : non assigné



## ANNEXE 2



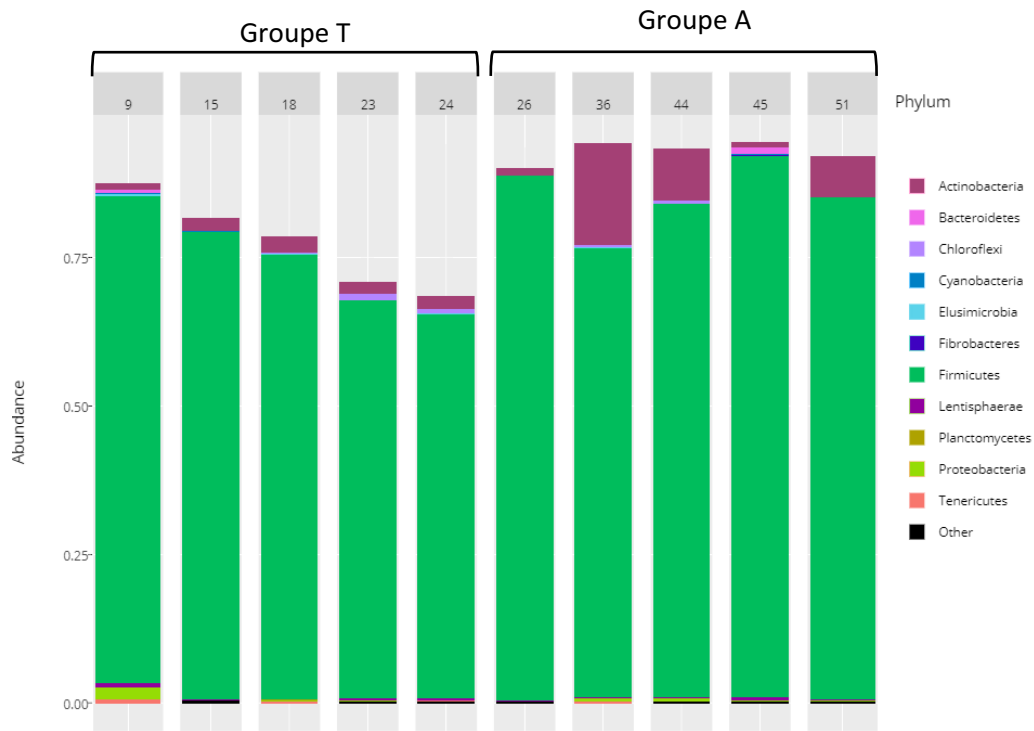
**Figure S1 : Analyse en composante principale (PCoA) de la diversité et de l'abondance bactérienne des animaux du groupe T. (A) méthode unweighted Unifrac ; (B) méthode weighted Unifrac. Le pourcentage de variation expliqué par PC1 et PC2 est indiqué sur les axes**

**Tableau S1 : Description de la composition des contenus digestifs et fèces des bovins des groupes A et T**

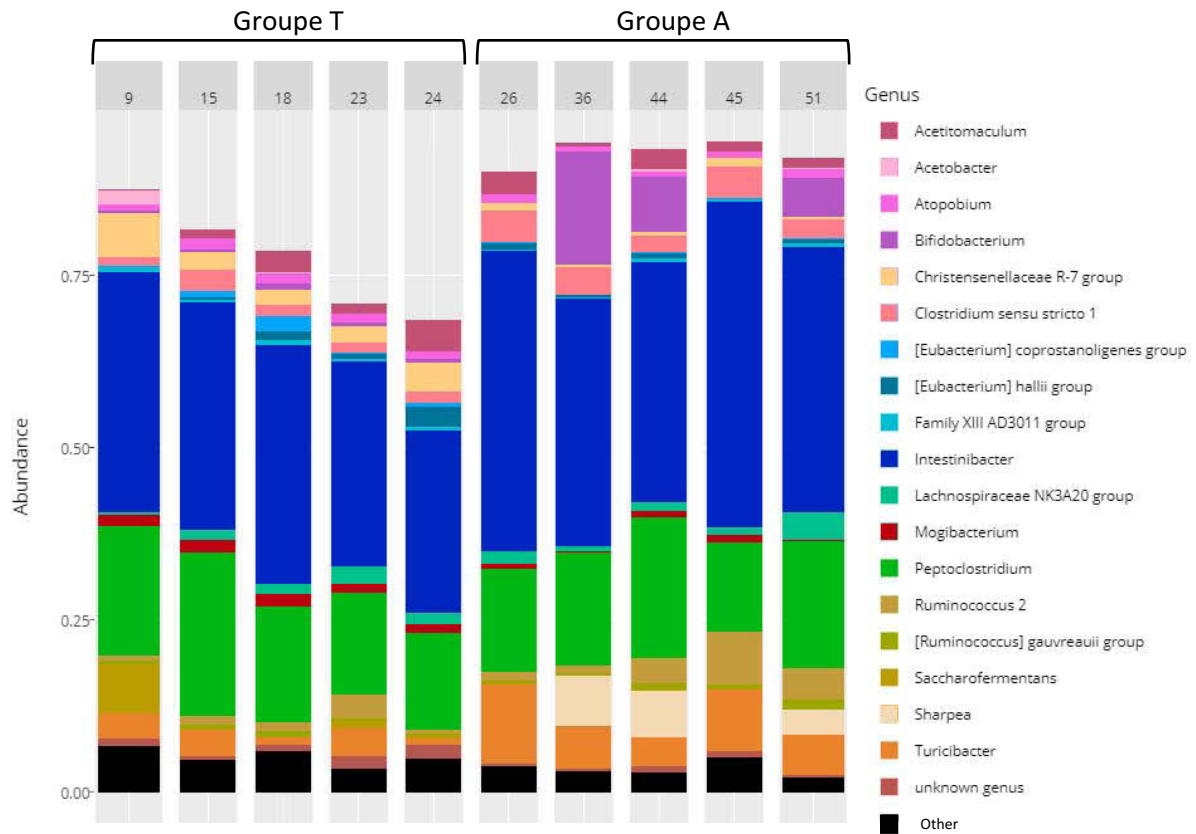
SampleID	Nb domaine	Nb phylum	Nb classe	Nb ordre	Nb famille	Nb genre	Nb espèce	Nb séquence
<b>GROUPE T</b>								
Rumen_avant_inoculation_C9	2	17	27	33	46	112	135	8,517
Rumen_avant_inoculation_C15	2	17	29	35	46	112	127	7,191
Rumen_avant_inoculation_C18	2	16	30	41	56	124	150	6,708
Rumen_avant_inoculation_C23	2	19	31	39	53	118	142	6,337
Rumen_avant_inoculation_C24	2	18	31	37	50	118	142	7,134
Feces_avant_inoculation_9	2	14	24	27	45	101	106	9,911
Feces_avant_inoculation_15	2	13	23	28	45	103	109	10,33
Feces_avant_inoculation_18	2	11	21	22	39	99	106	7,469
Feces_avant_inoculation_23	2	13	23	26	44	101	108	12,247
Feces_avant_inoculation_24	2	13	24	28	46	101	106	12,197
Rumen_C9	2	18	28	34	49	110	131	8,453
Rumen_C15	2	18	31	33	47	124	139	6,897
Rumen_C18	2	17	32	43	59	139	160	7,398
Rumen_C23	2	19	33	43	56	126	146	7,207
Rumen_C24	2	17	29	34	48	128	153	10,085
Ileon_C9	2	11	17	19	26	61	67	9,748
Ileon_C15	2	14	19	21	30	76	83	14,869
Ileon_C18	2	11	17	19	26	65	70	11,402
Ileon_C23	2	12	18	20	26	71	77	12,972
Ileon_C24	2	12	18	19	25	62	70	11,59
Caecum_C9	2	14	26	30	47	104	108	7,392
Caecum_C15	2	14	22	24	42	102	107	8,84
Caecum_C18	2	14	24	25	42	104	111	7,986
Caecum_C23	2	15	25	29	47	110	116	7,851

Caecum_C24	2	14	23	24	42	104	108	6,173
Colon_spirale_C9	2	14	24	28	45	107	113	8,356
Colon_spirale_C15	2	14	22	23	40	102	107	10,882
Colon_spirale_C18	2	14	26	29	48	112	121	7,265
Colon_spirale_C23	2	15	27	32	50	115	120	8,012
Colon_spirale_C24	2	13	21	23	40	97	103	5,908
Colon_descendant_C9	2	12	23	29	48	108	112	6,982
Colon_descendant_C15	2	14	21	24	41	103	107	9,417
Colon_descendant_C18	2	13	20	23	40	95	102	8,085
Colon_descendant_C23	2	16	27	33	52	122	132	8,208
Colon_descendant_C24	2	15	25	27	47	106	111	7,268
Rectum_9	2	14	25	28	46	106	112	9,366
Rectum_15	2	14	23	24	42	97	101	7,581
Rectum_18	2	13	23	25	43	96	100	5,312
Rectum_23	2	14	23	29	47	105	109	8,813
Rectum_24	2	12	23	24	41	99	104	7,48
<b>GROUPE A</b>								
Rumen_avant_inoculation_C26	2	17	30	41	55	125	142	9,523
Rumen_avant_inoculation_C36	2	17	28	33	46	109	129	6,304
Rumen_avant_inoculation_C44	2	17	29	37	54	107	122	16,66
Rumen_avant_inoculation_C45	2	15	27	32	44	110	135	8,764
Rumen_avant_inoculation_C51	2	15	25	29	43	97	112	9,565
Feces_avant_inoculation_26	2	12	23	27	44	91	95	7,874
Feces_avant_inoculation_36	2	12	21	26	44	93	96	6,819
Feces_avant_inoculation_44	2	13	21	23	39	87	92	7,112
Feces_avant_inoculation_45	2	12	22	26	43	96	103	12,435
Feces_avant_inoculation_51	2	13	25	29	47	103	108	8,591
Rumen_C26	2	18	30	40	54	132	154	10,039
Rumen_C36	2	15	27	31	45	123	146	9,466
Rumen_C44	2	17	28	35	48	127	145	11,723
Rumen_C45	2	16	26	30	45	108	130	8,713
Rumen_C51	2	16	27	34	48	108	124	9,675
Ileon_C26	2	12	19	20	27	65	71	13,734
Ileon_C36	2	10	17	20	26	61	67	12,997
Ileon_C44	2	12	17	18	26	63	69	15,757
Ileon_C45	2	11	16	17	28	65	73	12,694
Ileon_C51	2	10	14	15	21	59	65	15,845
Caecum_C26	2	10	17	18	33	89	94	6,728
Caecum_C36	2	15	23	27	47	109	118	10,32
Caecum_C44	2	13	21	26	43	100	106	9,522
Caecum_C45	2	13	23	24	42	88	95	7,616
Caecum_C51	2	9	15	17	33	97	103	8,7
Colon_spirale_C26	2	8	16	18	32	90	96	8,001
Colon_spirale_C36	2	11	18	21	42	98	105	12,392

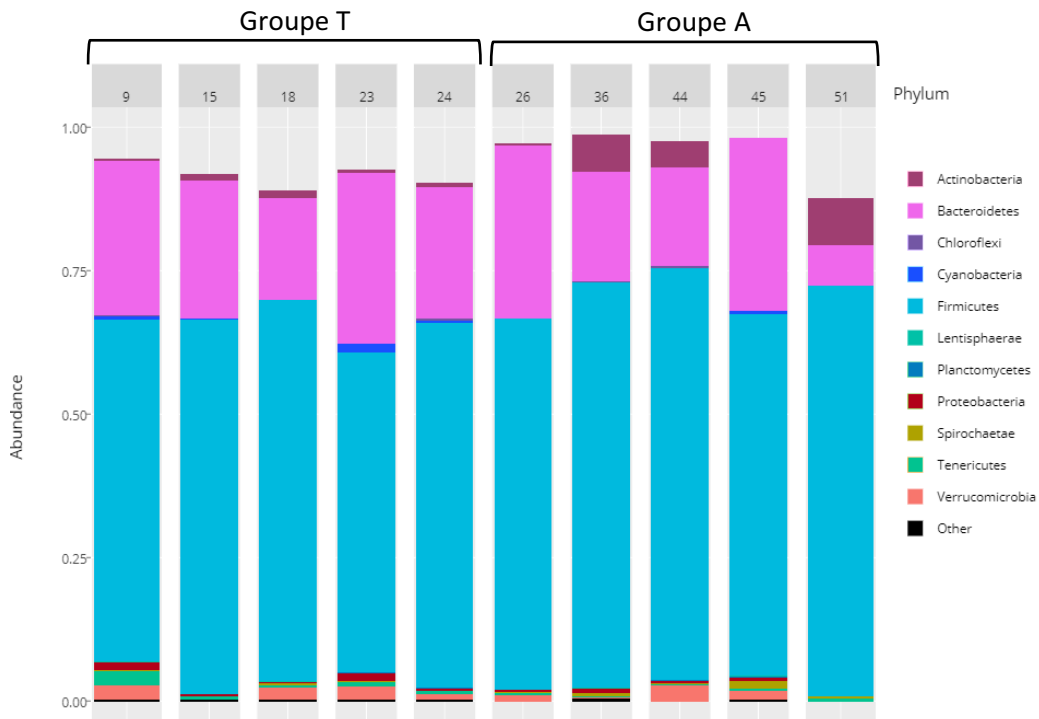
Colon_spirale_C44	2	13	22	25	42	97	103	8,239
Colon_spirale_C45	2	14	19	20	38	93	98	7,87
Colon_spirale_C51	2	12	21	23	39	94	101	8,54
Colon_descendant_C26	2	10	17	18	32	88	92	7,848
Colon_descendant_C36	2	13	22	27	47	104	110	8,274
Colon_descendant_C44	2	12	20	23	40	97	102	8,14
Colon_descendant_C45	2	14	23	24	42	94	99	7,549
Colon_descendant_C51	2	11	18	19	36	92	101	8,301
Rectum_26	2	13	24	29	47	105	111	9,729
Rectum_36	2	14	25	27	45	91	95	6,489
Rectum_44	2	13	24	29	49	101	107	6,693
Rectum_45	2	13	22	25	45	95	99	7,596
Rectum_51	2	12	23	24	44	99	105	10,207



**Figure S2 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus d'iléon prélevés le jour de l'euthanasie**



**Figure S3 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus d'iléon prélevés le jour de l'euthanasie**



**Figure S4 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de caecum prélevés le jour de l'euthanasie**



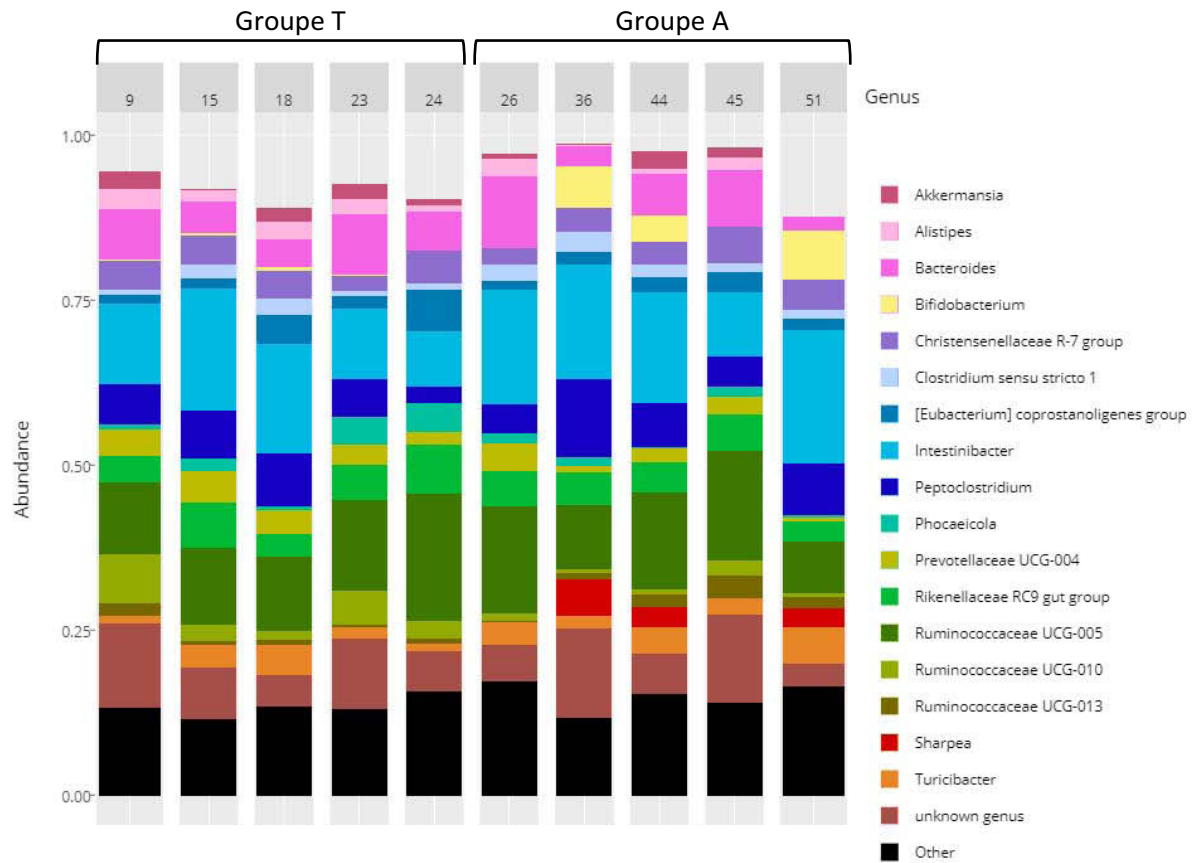


Figure S5 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de caecum prélevés le jour de l'euthanasie

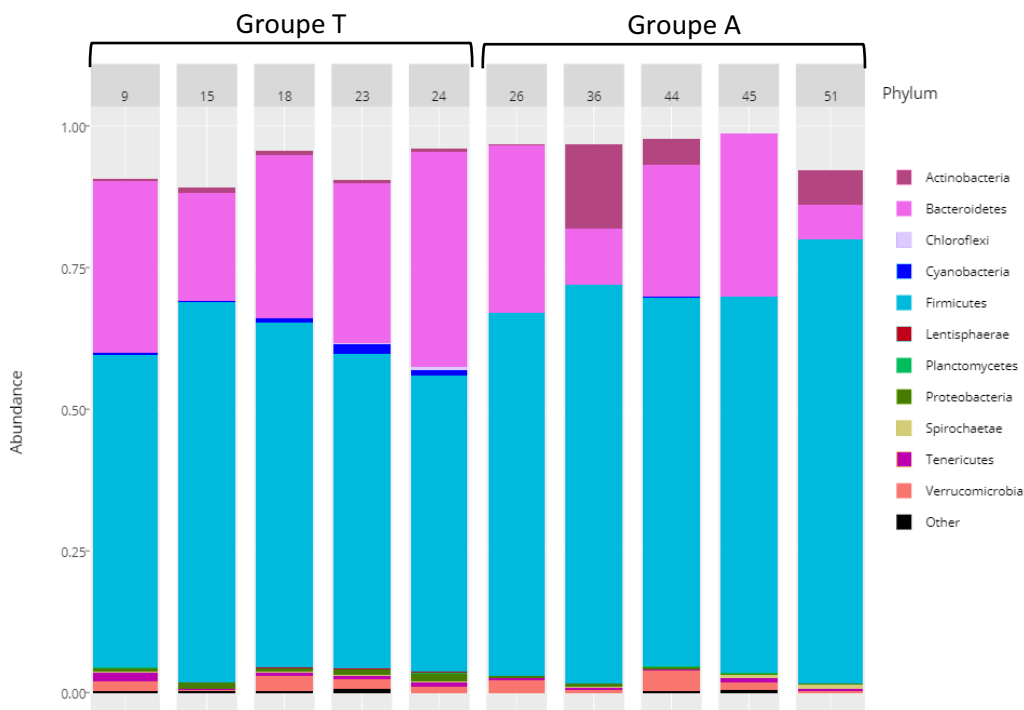
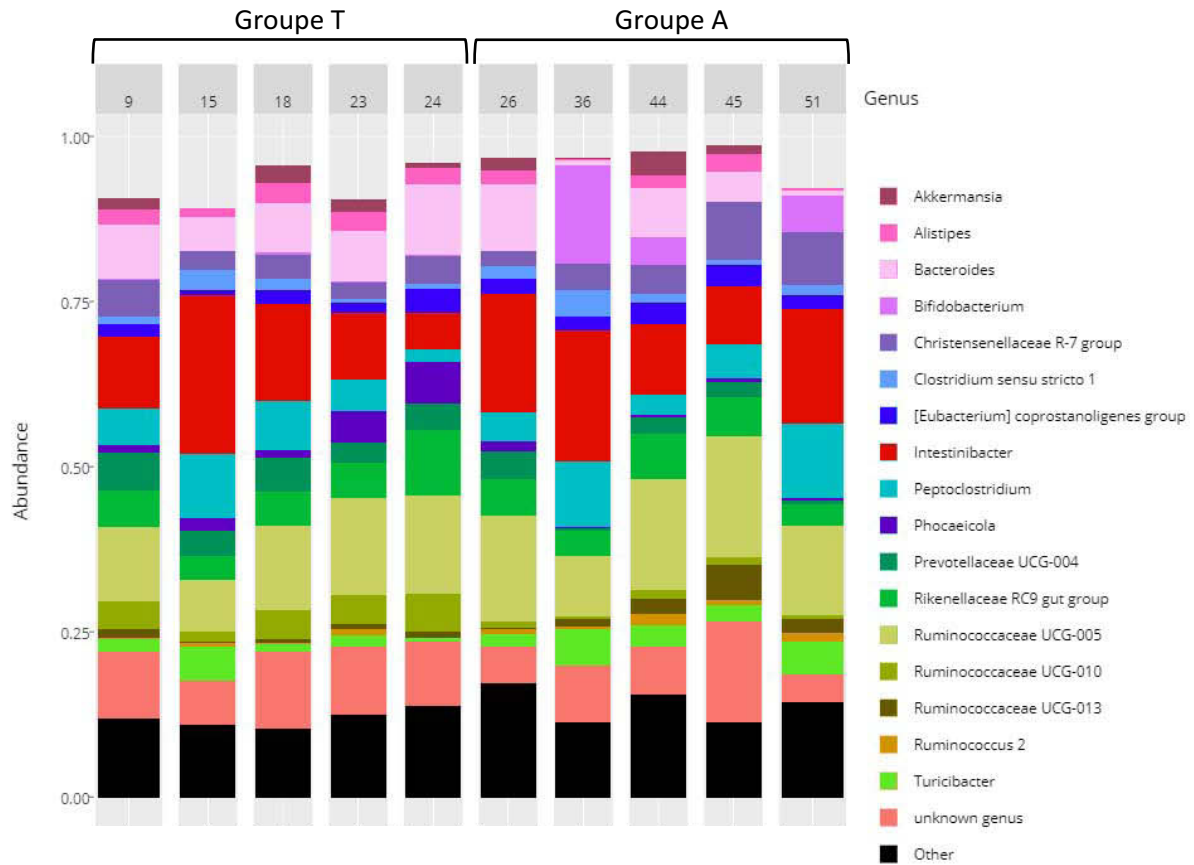
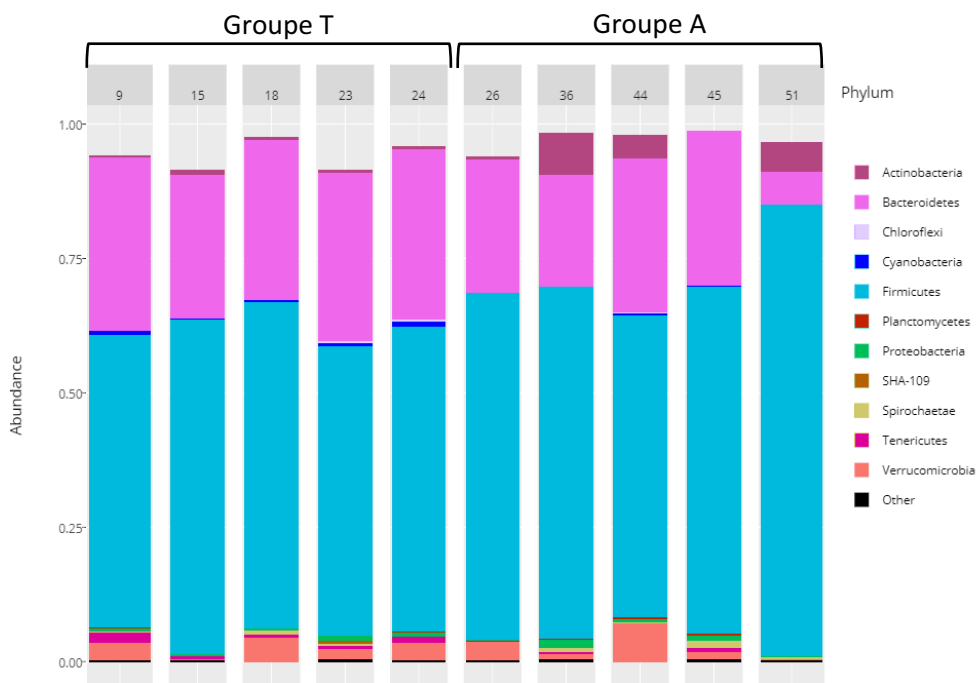


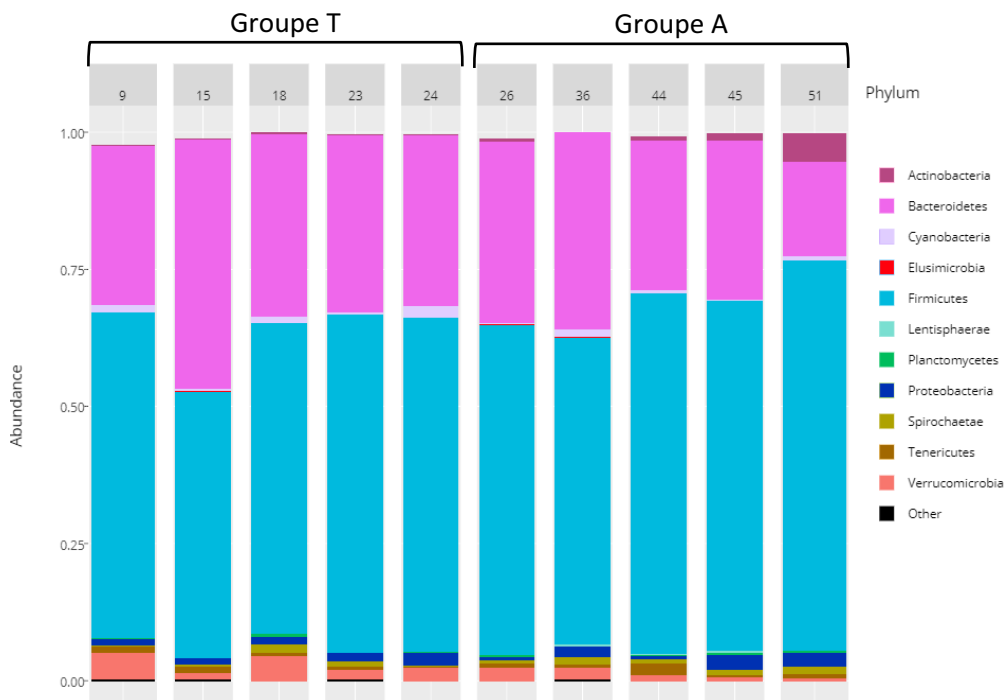
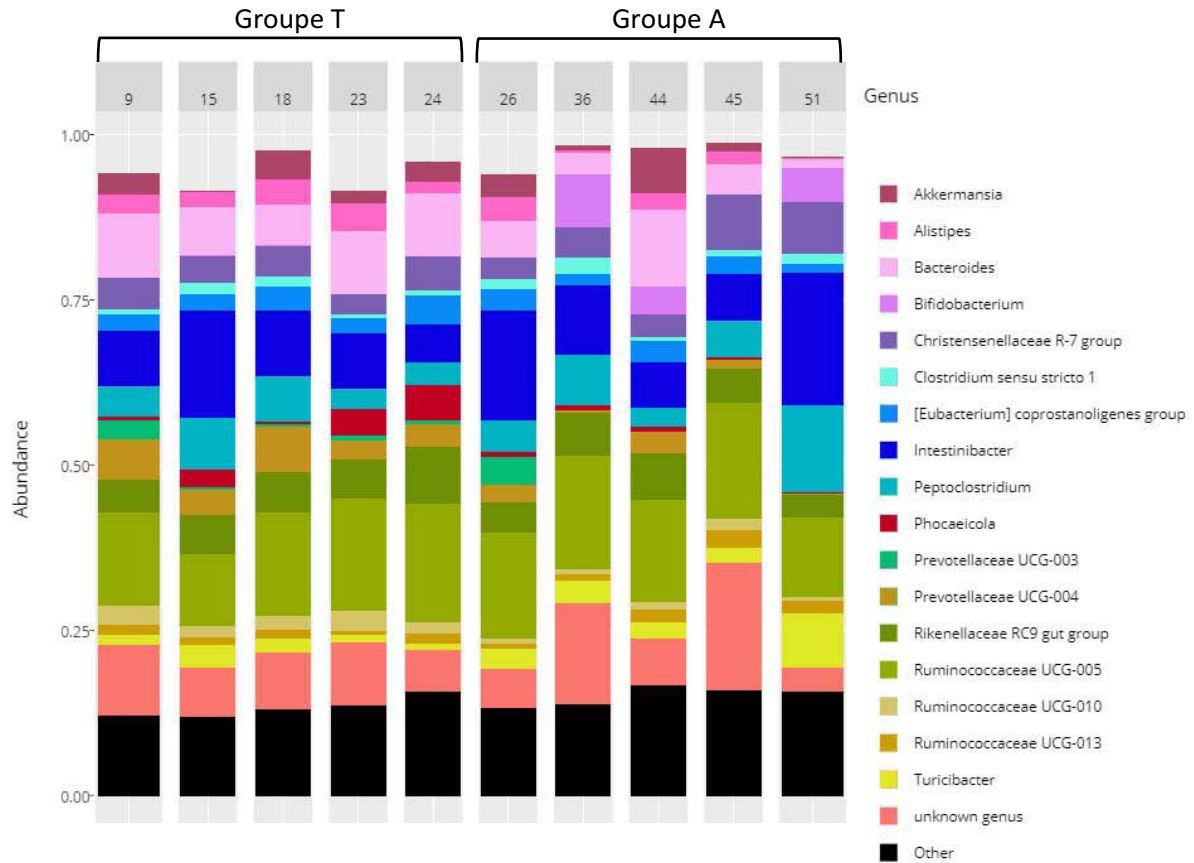
Figure S6 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de côlon spiralé prélevés le jour de l'euthanasie



**Figure S7 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de côlon spiralé prélevés le jour de l'euthanasie**



**Figure S8 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de côlon descendant prélevés le jour de l'euthanasie**



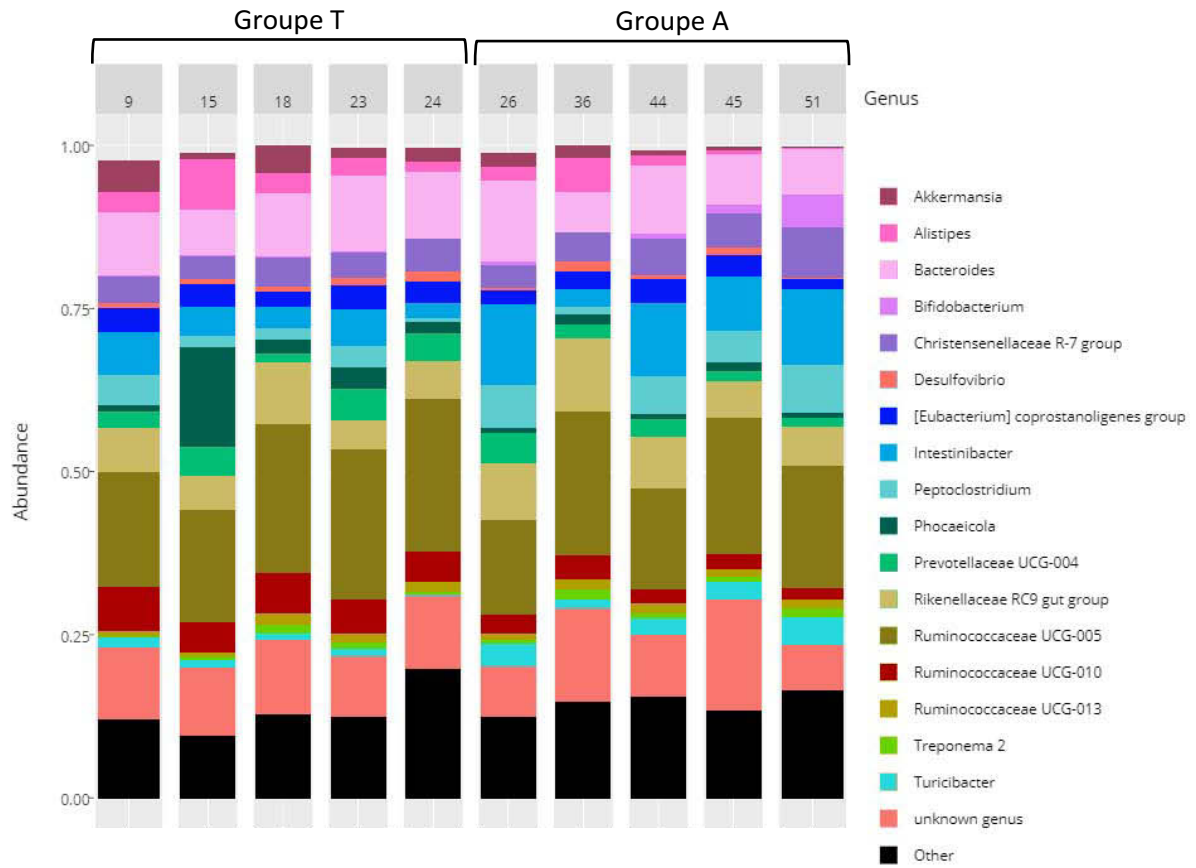
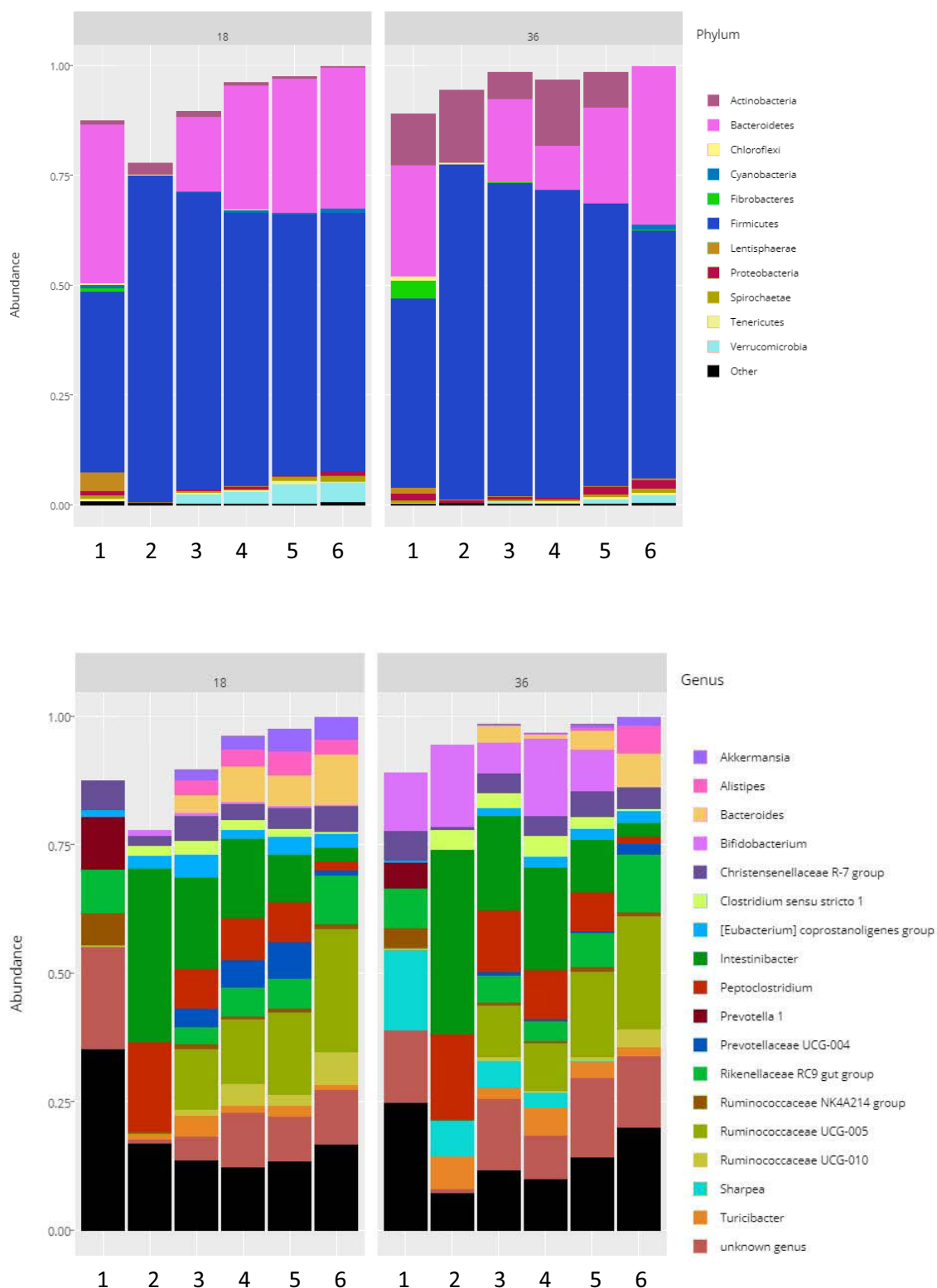
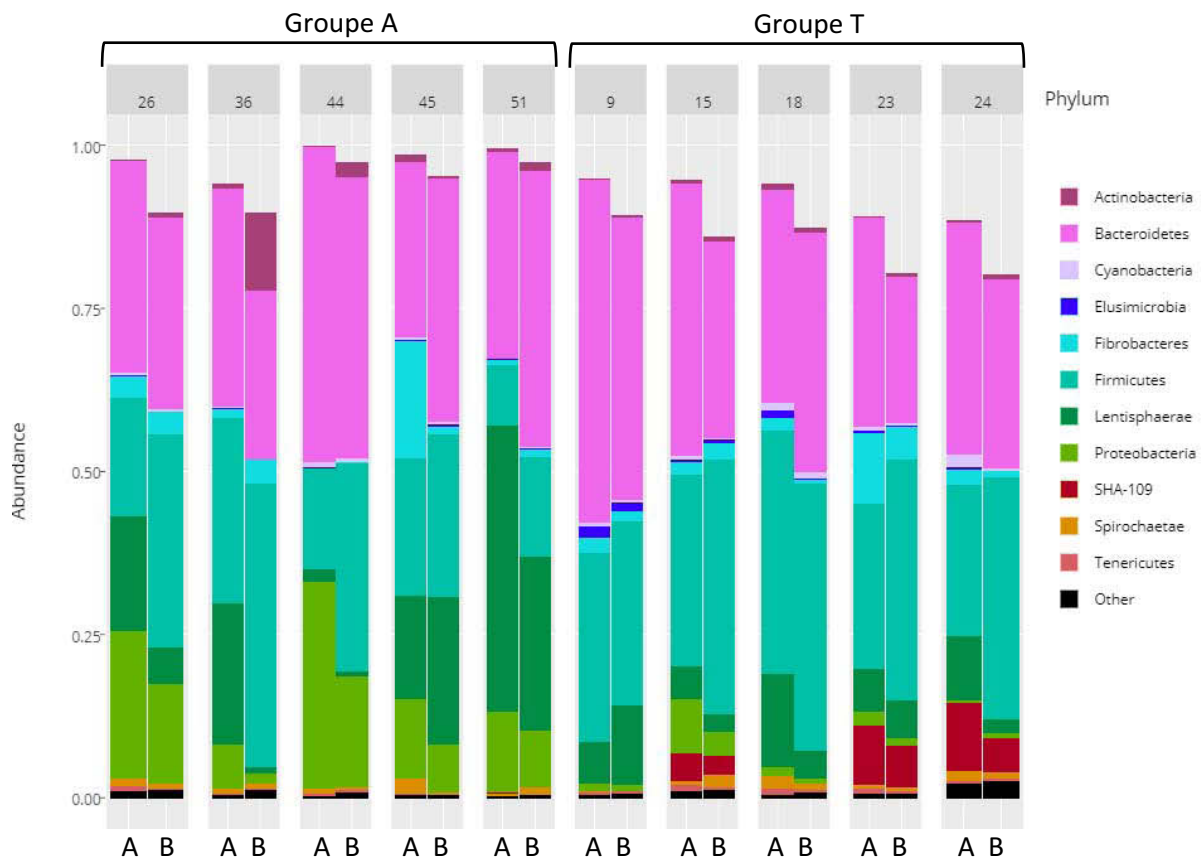


Figure S11 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rectum prélevés le jour de l'euthanasie

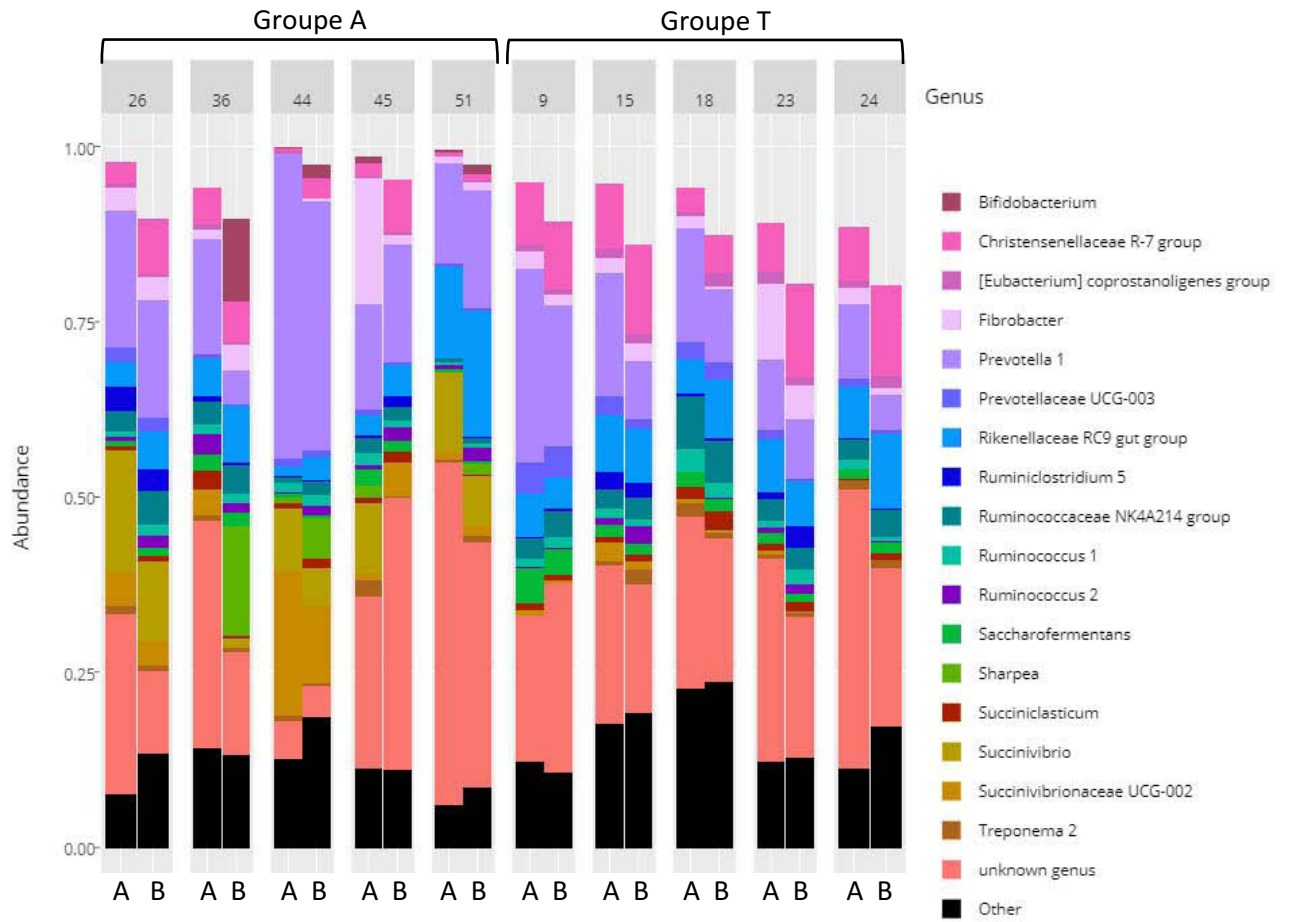


**Figure S12 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum et du genre des contenus digestifs prélevés le jour de l'euthanasie sur les animaux N°18 (groupe T) et N°36 (groupe A)**

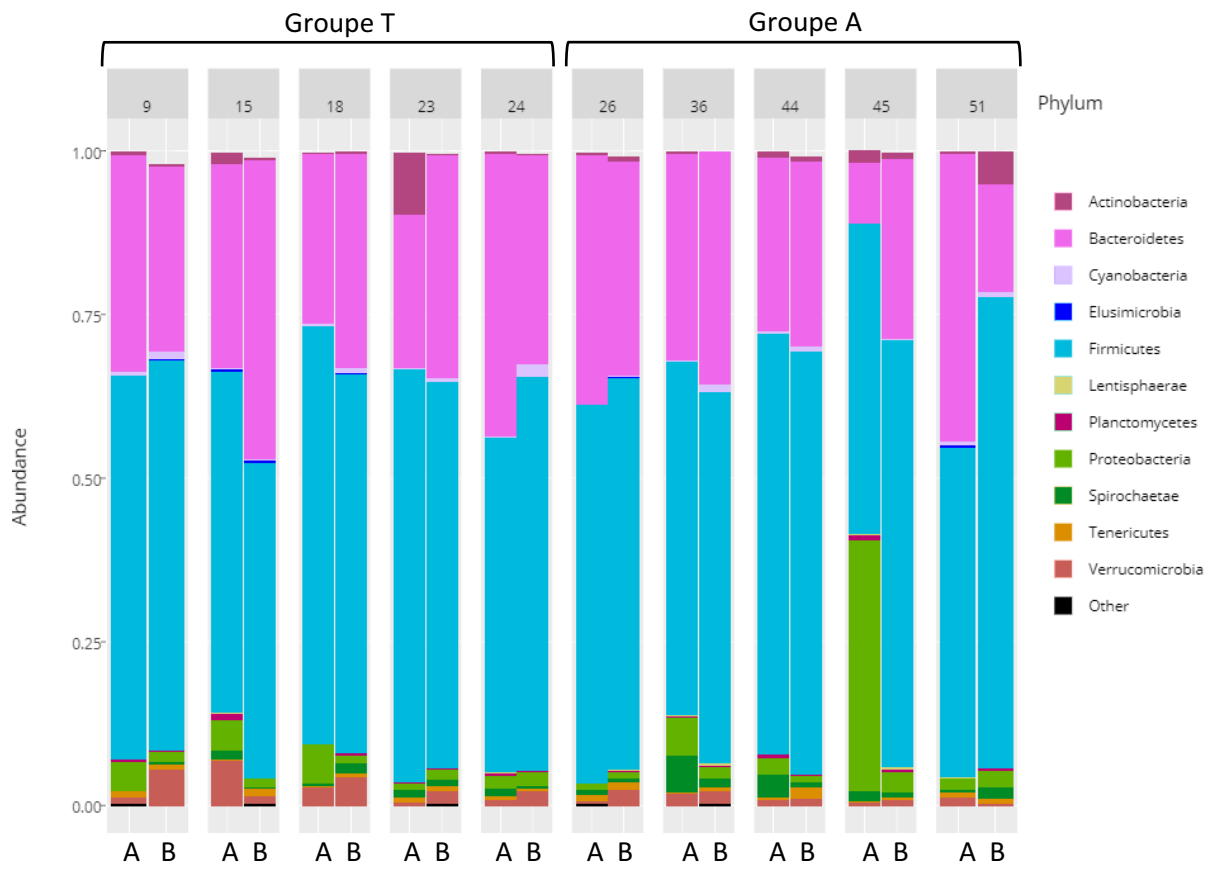
1. Rumen ; 2. Iléon ; 3. Caecum ; 4. Côlon spiralé ; 5. Côlon descendant ; 6. Rectum



**Figure S13 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rumen prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B)**



**Figure S14 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rumen prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B)**



**Figure S15 : Composition des communautés bactériennes au niveau du phylum des contenus de rectum prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B)**



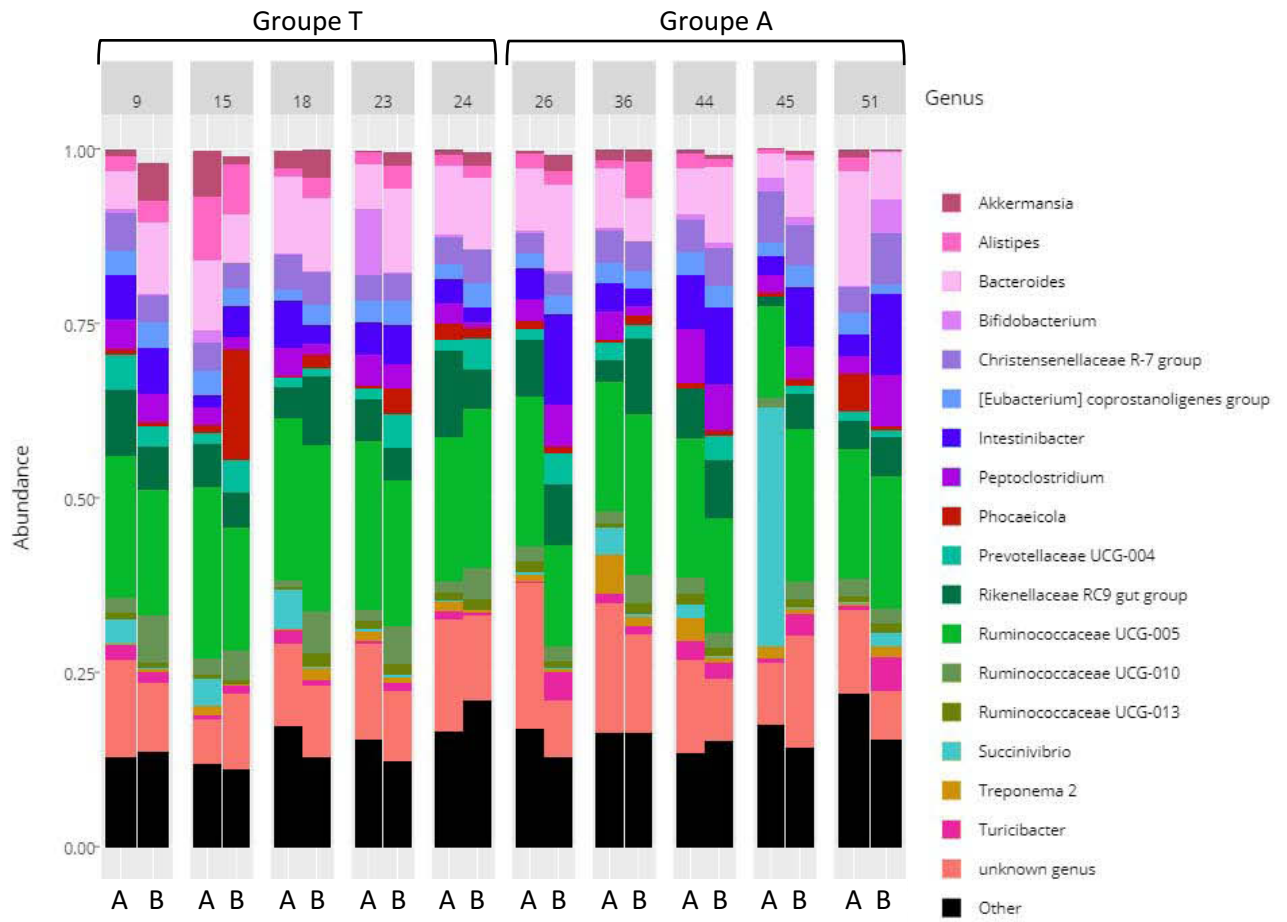


Figure S16 : Composition des communautés bactériennes au niveau du genre des contenus de rectum prélevés avant l'inoculation (A) et le jour de l'euthanasie (B)



## ANNEXE 3

***Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a preslaughter strategy to improve food safety?**

Yolande Bertin, Chloé Habouzit, Lysiane Dunière, Marie Laurier, Alexandra Durand, David Duchez, Audrey Segura, Delphine Thévenot-Sergentet, Federico Baruzzi, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano

**Abstract**

The bovine gastrointestinal tract (GIT) is the main reservoir for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) responsible for food-borne infections. Therefore, it is crucial to develop strategies, such as EHEC suppression by antagonistic microorganisms, to reduce EHEC survival in the GIT of cattle and to limit shedding and food contamination. Most human derived *Lactobacillus reuteri* strains produce hydroxypropionaldehyde (HPA), an antimicrobial compound, during anaerobic reduction of glycerol. The capacity of *L. reuteri* LB1-7, a strain isolated from raw bovine milk, to produce HPA and its antimicrobial activity against an O157:H7 EHEC strain (FCH6) were evaluated in bovine rumen fluid (RF) under strict anaerobiosis. EHEC was totally suppressed when incubated in RF inoculated with *L. reuteri* LB1-7 and supplemented with 80 mM glycerol (RF-Glyc80). The addition of LB1-7 or glycerol alone did not modify EHEC survival in RF. Glycerol was converted to HPA (up to 14 mM) by LB1-7 during incubation in RF-Glyc80, and HPA production appeared to be responsible for EHEC suppression. The bactericidal activity of *L. reuteri* LB1-7, the concentration of glycerol required and the level of HPA produced depended on physiological and ecological environments. *In vitro* experiments also showed that EHEC inoculated in rumen fluid and exposed to *L. reuteri* and glycerol had a very limited growth in rectal contents. However, *L. reuteri* exerted an antimicrobial activity against the rumen endogenous microbiota and perturbed feedstuff degradation in the presence of glycerol. The potential administration of *L. reuteri* and glycerol in view of application to finishing beef cattle at the time of slaughter is discussed. Further *in vivo* studies will be important to confirm the efficiency of *L. reuteri* and glycerol supplementation against EHEC shedding in ruminants.

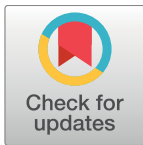


RESEARCH ARTICLE

# *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety?

Yolande Bertin<sup>1\*</sup>, Chloé Habouzit<sup>1</sup>, Lysiane Dunière<sup>1,2</sup>, Marie Laurier<sup>1</sup>, Alexandra Durand<sup>1</sup>, David Duchez<sup>3</sup>, Audrey Segura<sup>1</sup>, Delphine Thévenot-Sergentet<sup>4,5</sup>, Federico Baruzzi<sup>6</sup>, Frédérique Chaucheyras-Durand<sup>1,2</sup>, Evelyne Forano<sup>1</sup>

**1** Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, Clermont-Ferrand, France, **2** Lallemand SAS, Blagnac, France, **3** Institut Pascal—Axe GePEB, Polytech Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal, Aubière, France, **4** Research Group on Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment, UMR, Ecologie Microbienne, CNRS, VetAgro Sup, INRA and Université Lyon 1, Villeurbanne, France, **5** Laboratoire d'Étude des Microorganismes pathogènes, French Laboratory for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, VetAgro Sup, Campus vétérinaire, Marcy L'Etoile, France, **6** Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy, Bari, Italy



☯ These authors contributed equally to this work.

\* [yolande.bertin@inra.fr](mailto:yolande.bertin@inra.fr)

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Bertin Y, Habouzit C, Dunière L, Laurier M, Durand A, Duchez D, et al. (2017) *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety? PLoS ONE 12(11): e0187229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229>

**Editor:** Kumar Venkitanarayanan, University of Connecticut, UNITED STATES

**Received:** March 10, 2017

**Accepted:** October 16, 2017

**Published:** November 1, 2017

**Copyright:** © 2017 Bertin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Fonds unique interministériel (OSEO F1010011M) (EF); <http://competitivite.gouv.fr/le-lancement-du-10e-appel-a-projets-de-r-d-du-fui/les-resultats-du-10e-appel-a-projets-701.html>; European Regional Development Fund (33577) (EF); <http://www.europe-en-auvergne.eu/programme-massif->

## Abstract

The bovine gastrointestinal tract (GIT) is the main reservoir for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) responsible for food-borne infections. Therefore, it is crucial to develop strategies, such as EHEC suppression by antagonistic microorganisms, to reduce EHEC survival in the GIT of cattle and to limit shedding and food contamination. Most human-derived *Lactobacillus reuteri* strains produce hydroxypropionaldehyde (HPA), an antimicrobial compound, during anaerobic reduction of glycerol. The capacity of *L. reuteri* LB1-7, a strain isolated from raw bovine milk, to produce HPA and its antimicrobial activity against an O157:H7 EHEC strain (FCH6) were evaluated in bovine rumen fluid (RF) under strict anaerobiosis. EHEC was totally suppressed when incubated in RF inoculated with *L. reuteri* LB1-7 and supplemented with 80 mM glycerol (RF-Glyc80). The addition of LB1-7 or glycerol alone did not modify EHEC survival in RF. Glycerol was converted to HPA (up to 14 mM) by LB1-7 during incubation in RF-Glyc80, and HPA production appeared to be responsible for EHEC suppression. The bactericidal activity of *L. reuteri* LB1-7, the concentration of glycerol required and the level of HPA produced depended on physiological and ecological environments. *In vitro* experiments also showed that EHEC inoculated in rumen fluid and exposed to *L. reuteri* and glycerol had a very limited growth in rectal contents. However, *L. reuteri* exerted an antimicrobial activity against the rumen endogenous microbiota and perturbed feedstuff degradation in the presence of glycerol. The potential administration of *L. reuteri* and glycerol in view of application to finishing beef cattle at the time of slaughter is discussed. Further *in vivo* studies will be important to confirm the efficiency of *L. reuteri* and glycerol supplementation against EHEC shedding in ruminants.

[central.html](#); Conseil Regional d'Auvergne (CPER T2ANSH) (EF); <http://m.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid72550/le-contrat-de-projets-etat-region-auvergne-2007-2013.html>; LALLEMAND SAS provided support in the form of salaries for authors FCD and LD, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** FCD and LD are employees of LALLEMAND SAS but this commercial affiliation does not alter authors adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

## Introduction

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) responsible for severe human diseases such as haemolytic uraemic syndrome [1]. The majority of infections, commonly attributed to the consumption of contaminated food is caused by EHEC with serotype O157:H7 and the gut of ruminants, mainly cattle, is considered as the principal reservoir [2]. Therefore, it is important to develop nutritional or ecological strategies to reduce EHEC survival in the gastrointestinal tract (GIT) of cattle and to limit shedding and further contamination of food products.

Several approaches have been proposed to reduce the prevalence of *E. coli* O157:H7 in cattle, including feeding of antagonistic microorganisms, vaccination or bacteriophage treatment. Lactobacilli, which are known to exhibit an inhibitory effect against various enteric pathogens, are widely used as probiotics or direct-fed microbials in humans and animals [3, 4]. Lactobacilli display antimicrobial activities as a result of production of metabolites such as lactic acid, bacteriocins or other non-proteinaceous molecules [4].

*Lactobacillus reuteri* is used commercially as a probiotic microorganism and possesses antimicrobial properties against intestinal pathogens. It is well documented that specific *L. reuteri* can produce antimicrobial factors, such as hydroxypropionaldehyde (HPA) (also named reuterin), reutericyclin, reutericin, lactate or Mucus Adhesion-Promoting (MAP) protein [5, 6]. HPA has been proven effective against bacteria, fungi and protozoa survival [7, 8]. It has been postulated that HPA inhibits the activity of bacterial ribonucleotide reductase, a key enzyme catalysing the first step in DNA synthesis, which would explain the broad-spectrum activity of HPA [7, 9].

HPA is produced by *L. reuteri* during a two-step anaerobic fermentation of glycerol: a glycerol dehydratase first catalyses the conversion of glycerol to HPA and HPA is then reduced to 1,3 propanediol (1,3-PD) [7, 8]. In addition, *L. reuteri* is known to excrete HPA in high amounts when the level of fermentable carbohydrates is low [10]. In germfree mice, *L. reuteri* administration reduced both colonization and clinical signs due to EHEC infection and resulted in HPA production in the caecum [11].

In cattle, the terminal recto-anal junction has been referred as the major site of *E. coli* O157:H7 multiplication [12]. However, O157:H7 isolates are found throughout the GIT compartments (including the rumen) of experimentally infected calves and naturally shedding cattle [13, 14]. In addition, O157:H7 isolates in the rectum are clonally similar to isolates found in the rumen and fecal shedding has been shown to be positively associated with the presence of *E. coli* O157:H7 in the rumen [15]. All these observations demonstrate that the rumen is a reservoir for the contamination of hindgut compartments. Cattle regurgitate digesta during the rumination process and *E. coli* O157:H7 in the rumen may directly participate to EHEC dissemination in environment and to animal-to-animal transmission. In addition, quorum sensing molecules homoserine lactones (AHLs) promote EHEC colonization of the bovine gut [16]. Interestingly, AHLs are produced by the rumen microbiota but are not found in other GIT compartments highlighting the role of the rumen in the successful EHEC colonization of the bovine gut [16]. For all these reasons, among strategies for decreasing EHEC burden in cattle GIT, it can be proposed to focus on reducing EHEC survival in the rumen.

Because the rumen of cows is under strict anaerobiosis and contains a low level of easily fermentable carbohydrates, we speculated that *L. reuteri* could produce HPA at this site. In this study, we explored for the first time the potential growth inhibition exerted by *L. reuteri* towards EHEC in bovine rumen fluid. We tested several *L. reuteri* strains and demonstrated that *L. reuteri* LB1-7 isolated from raw bovine milk [17] produced HPA and could achieve a total suppression of EHEC in rumen fluid. *In vitro* experiments described in this study also

showed that the exposure of EHEC to *L. reuteri* and glycerol in rumen fluid decreased drastically EHEC inoculation of lower bovine digestive segments.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*L. reuteri* and EHEC strains used in this study are listed in [S1 Table](#). The EHEC strain FCH6 (O157:H7, *eae*<sup>+</sup>, *stx1*<sup>+</sup>, *stx2*<sup>+</sup>) had been isolated from a case of HUS in 2004 due to the consumption of raw milk cheese. EHEC strains were routinely cultured in Luria Bertani (LB) broth (Biokar, Beauvais, France). *L. reuteri* strains were routinely cultured in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Biokar, Beauvais, France). Spontaneous rifampicin-resistant mutants of *L. reuteri* and EHEC strains were isolated on MRS agar (pH 6.8) and LB agar plates containing 100 µg/mL of rifampicin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), respectively. Each wild-type strain and its corresponding spontaneous Rif<sup>R</sup> mutant showed identical growth patterns. Sensitivity of the rumen microbiota to rifampicin was confirmed by spotting 100 µL of rumen fluid (RF) samples on MRS agar plate containing rifampicin (50 µg/mL) before incubation at 39°C for 24 hours. Survival of *L. reuteri* in RF was tested by incubating RF samples (from O<sub>2</sub>-free, CO<sub>2</sub>-saturated sterile flasks) inoculated with *L. reuteri* Rif<sup>R</sup> under anaerobiosis (39°C). The next day, the RF samples were 10-fold serially diluted in sterile phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4), plated on MRS agar plates containing rifampicin and incubated overnight under anaerobiosis at 37°C for CFU counting. The experiments were replicated three times.

### Ethics statement

RF and Rec samples were collected from rumen-cannulated cows in the INRA “Herbipôle Experimental Unit”, Auvergne-Rhône-Alpes Research Centre, Saint Genès-Champanelle, France (agreement number: C6334517) for experiments specifically approved by the “Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale en Auvergne” (C2EA-02, permit number: 6895-2016091913586944V3). The animals were housed in individual stalls in the INRA “Herbipôle” experimental facilities in accordance with the guidelines of the local ethics committee. Small intestine and caecum contents were collected after the slaughter of animals required in the experimental slaughterhouse of the INRA “Herbipôle Experimental Unit” (permit number: APAFIS#1765–2015091516305 v3). Animals were slaughtered in accordance with the guidelines of the local Ethics Committee and current INRA ethical guidelines for animal welfare by stunning immediately followed by jugular vein bleeding performed by specifically trained abattoir staff (Permit number: 63345001).

### Animals and digestive contents sampling

RF samples and rectum contents (Rec) were collected from non-lactating rumen-cannulated Holstein cows (live weight 800 kg on average). They were fed a diet composed of meadow hay and pelleted concentrate (INRA 50183 GV) and 250 g of mineral and vitamin complex. Cows were fed 8 kg of hay, 2 kg of concentrate (DM) in one meal, distributed at 8:00 in the morning.

RF samples were collected manually before feeding through the rumen cannula in O<sub>2</sub>-free, CO<sub>2</sub>-saturated sterile and pre-warmed (39°C) flasks as previously described [18]. The samples were immediately filtered through four layers of cheesecloth into CO<sub>2</sub>-saturated sterile flasks. RF samples (pH 6.2 on average) were confirmed to be negative for O157 *E. coli* before experiments: i) no colony was obtained after 24 h of incubation of the samples on MacConkey agar containing sorbitol (SMAC) and ii) the genes *stx2*, *rfbE* and *fliC* were not amplified from RF

DNA (oligonucleotides used in PCR amplification were described in [S2 Table](#)). Bacterial counts from freshly collected RF samples were performed under anaerobiosis using the Most Probable Number (MPN) method and revealed the presence of  $\approx 5 \times 10^{10}$  MPN/mL. At least two cows at three different days were used for each experiment with RF samples. After sampling, rectum contents were rapidly transferred to O<sub>2</sub>-free, CO<sub>2</sub>-saturated sterile flasks, diluted (1:1) in sterile reduced potassium phosphate buffer (50 mM potassium phosphate, resazurin 0.1%, 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mM cysteine, pH 7) and used immediately. Three different cows were used for experiments with Rec samples. Small intestine and caecum contents were collected from three cows at slaughter as previously described [\[19\]](#), rapidly transported to the laboratory, pooled in equal proportions and stored at -20°C until use.

### Agar spot test

An agar spot test was performed to detect antimicrobial activity of *L. reuteri* strains as previously described [\[20\]](#). The antimicrobial activity was recorded as growth-free inhibition zones (diameter > 1 mm) around the spots.

### *In vitro* HPA production by *L. reuteri*

HPA was produced under anaerobiosis in PBS buffer (pH 7.4) and RF samples using a two-step fermentation protocol [\[20\]](#). Briefly, RF samples were first centrifuged twice at 4100 g for 20 min and the supernatants were filter-sterilized through 0.45- $\mu$ m nylon filter (Merck-Millipore, St Quentin en Yvelines). The filtrate was placed into glass tubes and left without stoppers in an anaerobic chamber (Jacomex, France) (100% CO<sub>2</sub>) during three days to allow the rumen fluid filtrate to be under anaerobic conditions. The tubes were then recapped with butyl rubber stoppers and filtered again (0.45  $\mu$ m) under CO<sub>2</sub> flux. *L. reuteri* strains were incubated in MRS broth without shaking under anaerobiosis for 24 hours at 37°C. The cultures were then centrifuged (4100 g, 10 min), washed in sterile PBS buffer and adjusted to  $\approx 10^9$  CFU/mL in O<sub>2</sub>-free, CO<sub>2</sub>-saturated PBS or filter-sterilized RF samples supplemented with 250 mM glycerol (Fisher-Aldrich). After incubation for 2 hours at 37°C, the bacterial cultures were pelleted and HPA-containing supernatants were collected and filtered (0.22- $\mu$ m) before storage at 4°C.

### HPA quantification

HPA production was quantified by a tryptophan-HCl colorimetric assay as previously described [\[10\]](#). Briefly, the HPA-containing supernatants were diluted (10-fold) in sterile H<sub>2</sub>O, mixed with 10 mM tryptophan solution (0.01 M in 0.05 HCl, stabilized with a few drops of toluene) and 12 M HCl before incubation for 30 min at 37°C. Optical density (OD<sub>560</sub>) was measured with a spectrophotometer Spectronic BioMate™ 3 (Thermo Scientific). Acrolein (Fisher-Aldrich) was used as standard (the method is specific to both reuterin and acrolein quantification [\[10\]](#)). Standard curves were generated using an acrolein solution diluted to a concentration range of 0–20 mM in PBS or filter-sterilized RF. All the samples were filtered (0.45  $\mu$ m) and diluted in PBS buffer if necessary.

### Co-incubation of EHEC and *L. reuteri* strains

Pre-cultures of EHEC FCH6 Rif<sup>R</sup> or EDL933 Rif<sup>R</sup> inoculated from a single colony were incubated aerobically overnight at 37°C in LB supplemented with rifampicin. Bacterial cultures were then centrifuged (4100 g, 10 min) and the pellets were resuspended in sterile PBS buffer. At the same time, *L. reuteri* strains were cultured in MRS broth for 24 hours (37°C) without shaking. RF samples or LB broth (5 mL) were introduced into glass tubes equipped with butyl



stoppers and screwed caps (Hungate tubes) under a 100% CO<sub>2</sub> atmosphere. Ground feed (25 mg) was then added to RF samples (80% meadow hay, 20% concentrate) to mimic a feeding cycle. RF samples or LB broth were inoculated with both *L. reuteri* ( $\approx 10^7$  CFU/ml) and the EHEC Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) strains. To mimic the physiological conditions encountered in the rumen, the cultures were incubated under strict anaerobiosis at 39°C (bovine temperature) for 24 hours ( $\approx$  transit time of forage-rich digesta) with gentle shaking (mixing of digesta). The bacterial cultures were then 10-fold serially diluted in PBS and spotted (10  $\mu$ L) in triplicate on LB plates containing rifampicin before incubation overnight at 37°C. Each experiment was performed independently at least three times. The values presented are the log<sub>10</sub> mean number of CFU/mL.

### *In vitro* feedstuff degradation by the rumen microbiota

The effect of *L. reuteri* on feedstuff degradation by the rumen microbiota was assessed using the *in vitro* Daisy II incubation system (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). This system allows evaluation of feed digestibility during simultaneous incubation of up to 4 glass vessels, which rotate in an insulated chamber maintained at 39.5°C ( $\approx$  rumen temperature) [21–23]. RF samples were diluted (1:4, vol:vol) with Goering and Van Soest (GVS) anaerobic buffer [24] and dispensed under O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> atmosphere. Feedstuff, under the form of alfalfa hay (AH) or corn silage (CS) (0.25 g of each forage, ground to 1 mm particle size), was bagged (ANKOM filter bags F57, porosity 25  $\mu$ m, 5.0 cm $\times$ 5.5 cm) and incubated in the presence of diluted RF for 24 hours. Six glass beads (4 mm diameter) were added to each bag to improve bag immersion in the rumen fluid as previously described [22]. All filter bags were heat-sealed at 0.5 mm from the edge of the bags. One bag with only 6 glass beads was also placed in each jar as blank. Six replicates for each feedstuff were used, and the experiment was repeated three times with RF collected at one-week intervals. For each replicate, one vessel was used as control and contained only RF, buffer, AH and CS bags, and one was inoculated with  $\approx 10^7$  CFU/mL of *L. reuteri* LB1-7 and 80 mM glycerol at the start of incubation. *L. reuteri* suspension was prepared from an overnight MRS culture at 37°C. The culture was centrifuged and resuspended in GVS buffer. pH was monitored at the start and end of incubation in a 10 mL sample of the incubation mix. Samples were collected and stored (-20°C) for fermentation end products analysis and microbial populations quantification by qPCR (see sections below). After 24 hours of incubation, bags were removed, washed with tap water and dried at 65°C for at least 48 hours for determination of residual DM. Six bags of each feedstuff were not incubated in order to assess passive DM loss by tap water washing. It was then possible to calculate the disappearance of DM (%).

### Analysis of fermentation products in the RF samples

Metabolites were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described [25]. The method was calibrated to detect acetate, citrate, pyruvate, fructose, glucose, lactate, glycerol, 1,3-PD, propionate, isobutyrate, ethanol, butyrate, isovalerate and valerate. The amount of undissociated lactate was calculated using the formula: undissociated acid (mM) = total acid (mM) / (1 + 10<sup>pH-pKa</sup>) [26]. The pH value of RF was 6.2 and the pKa value of lactate is 3.86.

### Incubation of EHEC in rectum contents

Survival of EHEC during its passage in different segments of the bovine GIT was simulated. To this, we performed a first incubation of EHEC in filter-sterilized RF samples (FS-RF) (0.22  $\mu$ M) followed by a second incubation in Rec samples (RF samples were indeed filtered in

order to retrieve only the inoculated bacteria and not the feed particles neither the rumen endogenous microbiota). Briefly, RF samples were centrifuged, filter-sterilized and placed into glass tubes in an anaerobic chamber as described above. The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) was incubated under strict anaerobiosis with gentle shaking in FS-RF samples (5 mL) inoculated or not with *L. reuteri* ( $\approx 10^7$  CFU/mL) and supplemented with 80 mM glycerol. After 24 hours of incubation at 39°C, the samples were centrifuged (4100 g, 10 min) and the bacterial pellet (containing potentially *L. reuteri* and/or EHEC) was suspended in sterile CO<sub>2</sub>-saturated PBS (0.5 mL). The bacterial suspension was then inoculated into Rec samples freshly collected (containing its endogenous microbiota) (5 mL) and incubated at 39°C under anaerobiosis. The concentration of EHEC Rif<sup>R</sup> was measured after 24h of incubation in FS-RF and after 6 and 24 hours of incubation in Rec samples.

## DNA extraction

Genomic DNA from pure culture of *L. reuteri* was extracted using the Easy-DNA™ kit (Fisher Scientific, Illkirch, France). The *L. reuteri* strains were cultured aerobically for 24 hours in MRS broth at 37°C without shaking. The next day, the bacterial cultures were centrifuged (10,000 g, 15 min) and the pellet was washed twice in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 8). Initial cell lysis was performed using proteinase (Easy-DNA™ kit) for 5 min at 37°C. Bacterial cells were then disrupted by bead beating for 3 min with 0.2 g of zirconia beads (0.1 mm diameter, Sigma-Aldrich). Subsequent genomic DNA extraction was performed according to the manufacturer's recommendations.

Total DNA from the rumen and intestinal contents was extracted as previously described [27]. Briefly, bacterial cells were suspended in buffer (50 mM Tris buffer, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 4% SDS) (pH 8) and disrupted by bead beating for 3 min with zirconia beads. The mixture was incubated at 70°C for 15 min and centrifuged (16,000 g for 2 min at 15°C). The resulting supernatant was then precipitated, washed and resuspended as previously described [27]. Contaminating RNA was removed using a DNase-free RNase (10 mg/mL) and an additional incubation for 15 min at 37°C with 15  $\mu$ L of Proteinase K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) was also performed. Subsequent DNA purification was performed using the Qiamp Fast DNA Stool mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

## Oligonucleotide primer design and PCR screening

*L. reuteri* genes were detected by PCR amplification using the primer pairs described in S2 Table. The primers used to detect *Lactobacillus* spp. target a 16S rRNA sequence conserved among *Lactobacillus* spp. but also *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. and *Weissella* spp. [28]. Therefore, in this study, the bacteria detected by these primers were designed as *Lactobacillus* group. DNA sequences from *L. reuteri* available in databases (JCM 1112 [AP007282.1], DSM 20016 [CP000705.1], FUA3400 [KJ435307.1], SD2112 [CP002844.1], BR11 [GU191838.1] and BPL36 [JQ897939.1]) were aligned (Align Sequences Nucleotide BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>]) to design the primer pairs used to amplify the genes *gldC* and *dhaT* (S2 Table). Amplification was performed from genomic DNA extracted from *L. reuteri* strains as described above. Taq polymerase and enzyme buffer were from MP-Biomedicals (Illkirch, France). The PCR procedure was performed on a Mastercycler Personal apparatus (Eppendorf) using the following programme: initial denaturation at 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final elongation at 72°C for 10 min.

## Bacterial enumeration in RF samples by quantitative-PCR

Total bacteria, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *L. reuteri* and the *Lactobacillus* group were quantified by quantitative PCR (q-PCR). The q-PCR quantification was performed as previously described [27]. The primer pairs targeting the *rrs* and *hsp60* genes are described in S2 Table. The standard curves ( $10^8$  to  $10^3$  *rrs* or *hsp60* copies) targeting *Lactobacillus* group and *L. reuteri*, respectively, were established from genomic DNA extracted from *L. plantarum* and *L. reuteri* strains. DNA extracted from RF samples inoculated with LB1-7 and *L. plantarum* ( $\approx 10^6$  CFU/mL) was used as positive and negative control respectively for *L. reuteri* quantification. The standard curves ( $10^8$  to  $10^3$  *rrs* copies) targeting *R. flavefaciens* and *F. succinogenes* and total bacteria were established as previously described [27].

## Statistical analysis

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with the GraphPad Instat statistical software (La Jolla, CA, USA). Student's *t*-test was used to compare means and discuss the effect of *L. reuteri*. All tests were two-tailed paired and the level used to establish significance was  $P < 0.05$ .

## Results

### Survival of EHEC in bovine rumen fluid

The fate of the spontaneous rifampicin mutants of EHEC FCH6 and EDL933 (S1 Table) was assessed in rumen fluid (RF) containing endogenous microbiota under *in vitro* culture conditions allowing the growth of the endogenous microbiota and mimicking the rumen physiological conditions (see the Materials and Methods section). A concentration of  $\approx 10^4$  EHEC/mL was chosen because 3–6  $\log_{10}$  colony-forming unit (CFU)/mL were enumerated from the rumen of steers experimentally infected with *E. coli* O157:H7 [29]. Results analysis showed that FCH6 Rif<sup>R</sup> survived well after incubation in RF samples (only 0.7  $\log_{10}$  decrease in CFU/mL after 24 hours of incubation) whereas the spontaneous Rif<sup>R</sup> mutant of the reference EHEC strain EDL933 (EDL933 Rif<sup>R</sup>) showed higher cell death after anaerobic incubation in RF (1.9  $\log_{10}$  decrease in CFU/mL) (S1 Fig). The strain FCH6 was thus selected for further studies.

### Ability of *L. reuteri* to produce HPA and to inhibit EHEC growth

Five *L. reuteri* strains (S1 Table) were tested for their ability to inhibit the growth of EHEC FCH6 on soft BHI agar plates. Results showed that FCH6 was susceptible to *L. reuteri* strains LB1-7 and F275 under anaerobiosis when 2% glycerol (217 mM) was added whereas it was poorly or not inhibited by the remaining *L. reuteri* strains, with or without glycerol supplementation (S2 Fig). *L. reuteri* strains were also tested by PCR to detect the genes *gldC* and *dhaT* encoding glycerol dehydratase large subunit (EC 4.2.1.30) (required to convert glycerol to HPA) and 1,3-propanediol dehydrogenase (EC 1.1.1.202) (required to reduce HPA to 1,3-PD), respectively. Amplified products with the expected size for *dhaT* were obtained from all the *L. reuteri* strains tested, whereas the amplicon specific for *gldC* was only obtained for *L. reuteri* LB1-7, F275 and 65A (S3 Fig). In accordance with the results of agar spot assay, *gldC* was not amplified from *L. reuteri* F70 and 100–23 genomic DNA. The capacity of *L. reuteri* strains to produce HPA was then tested in PBS buffer supplemented with 250 mM glycerol. Results showed that HPA production at 37°C under anaerobiosis was strain dependent since LB1-7, F275 and 65A produced 114, 84 and 19 mM HPA, respectively. As expected, HPA was not detected in the supernatant of *L. reuteri* strains 100–23 and F70. The production of HPA by *L. reuteri* was also tested in filter-sterilized RF samples supplemented with 250 mM glycerol:

the strains LB1-7 and F275 produced 189 and 105 mM HPA, respectively, whereas HPA was not detected in the presence of *L. reuteri* strains 65A, 100–23 and F70. In view of these results, the *L. reuteri* strain LB1-7 was chosen to perform co-incubation experiments. The *L. reuteri* strain 100–23 was used as negative control.

### Persistence of *L. reuteri* in bovine intestinal fluids

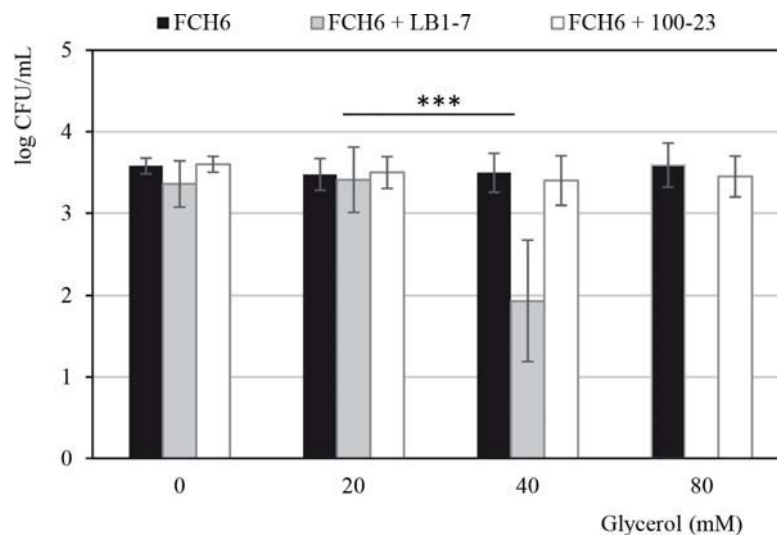
The quantification of *L. reuteri* and *Lactobacillus* group in intestinal contents was performed by qPCR amplification of the genes *hsp60* (encoding heat shock protein) and *rrs* (encoding 16S ribosomal RNA), respectively. *Lactobacillus* group was detected in RF samples ( $7.5 \log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA  $\pm 0.16$ ), small intestine contents ( $7.8 \log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA  $\pm 0.3$ ), caecum contents ( $7.4 \log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA  $\pm 0.09$ ) and rectum contents ( $7.6 \log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA  $\pm 0.05$ ). In contrast, *L. reuteri* was undetectable in all GIT compartments tested, including the rumen (detection limit:  $2 \log_{10}$  *hsp60* copies). The capacity of *L. reuteri* LB1-7 to grow in RF samples was then analyzed. After 24 hours of incubation in RF at  $39^\circ\text{C}$  under strict anaerobiosis, the spontaneous rifampicin-resistant mutants of LB1-7 (LB1-7 Rif<sup>R</sup>) was enumerated at a concentration similar to the inoculation rate ( $\approx 10^7$  CFU/mL), demonstrating the capacity of the strain to persist in RF.

### Antimicrobial activity of *L. reuteri* and antimicrobial potency of HPA against EHEC

The growth of EHEC FCH6 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) was tested in the presence of different concentrations of *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  CFU/mL) and glycerol (20, 40, 80 and 160 mM) in RF samples to determine the optimal conditions to decrease EHEC survival. The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> survived well after 24 hours of anaerobic incubation in RF samples in the absence of glycerol or supplemented with 20 or 40 mM glycerol whatever the *L. reuteri* concentration (S3 Table). In contrast, no EHEC CFU was enumerated when LB1-7 ( $10^7$  CFU/mL) was inoculated in RF supplemented with 80 or 160 mM glycerol (detection limit: 10 CFU/mL) (Fig 1). The inhibition of higher levels of EHEC ( $\approx 10^5$  and  $10^6$  CFU/mL) were also tested. *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) suppressed EHEC FCH6 in RF supplemented with 80 mM glycerol (RF-Glyc80) whatever the EHEC concentration. Similarly, co-incubation of *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) and EDL933 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) in RF-Glyc80 also resulted in EHEC suppression after 24 hours of anaerobic incubation. As expected, *L. reuteri* 100–23 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) had no effect on EHEC survival with or without glycerol (Fig 1). Results also showed that glycerol alone was not responsible for EHEC suppression since *L. reuteri* LB1-7 Rif<sup>R</sup> showed similar growth curves when incubated in RF and RF-Glyc80. This demonstrated the capacity of *L. reuteri* to persist in RF in the presence of glycerol. Different dilutions of HPA-containing supernatants were added to RF samples inoculated with FCH6 Rif<sup>R</sup> to test the antimicrobial potency of exogenous HPA. Addition of 25 mM HPA in RF samples (not inoculated with LB1-7) completely suppressed FCH6 Rif<sup>R</sup> after 2 hours of incubation.

### Production of HPA by *L. reuteri* in rumen fluids

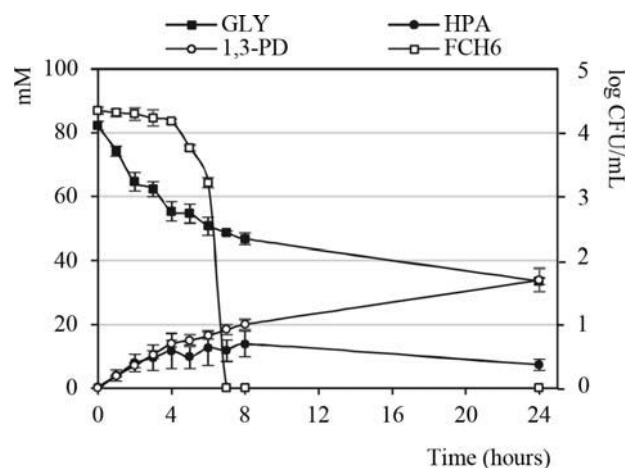
Kinetics of EHEC disappearance and HPA accumulation were monitored during co-incubation of FCH6 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) and LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) in RF-Glyc80. As shown in Fig 2, a significant decrease in EHEC population was observed from 4 hours of co-incubation ( $P < 0.05$ ) and no EHEC colony could be detected after 6 hours of co-incubation. A total suppression of EHEC was observed when HPA concentration reached  $\approx 12.5$  mM and a maximal HPA concentration (13.8 mM) was quantified after 8 hours of incubation (Fig 2). As expected, HPA and 1,3-PD accumulation correlated with glycerol disappearance and the glycerol



**Fig 1. Survival of EHEC co-incubated with *L. reuteri* strains in RF samples supplemented or not with glycerol.** The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was co-inoculated with  $\approx 10^7$  CFU/mL of *L. reuteri* LB1-7 (HPA producer) or 100-23 (negative control) in RF samples under anaerobiosis for 24 hours. The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> inoculated alone in RF samples was used as control. RF samples were supplemented or not with glycerol at different concentrations. Bars represent the SEM of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (\*\*\*:  $P < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.g001>

concentration was only 51 mM and 34 mM in RF-Glyc80 after 6 and 24 hours of co-incubation, respectively. The concentrations of HPA and 1,3-PD accumulated in RF-Glyc80 were similar during the first 8 hours of incubation. Noteworthy, the level of 1,3-PD reached 34 mM after 24 hours whereas a decrease in HPA concentration was observed (7.3 mM) (Fig 2 and Table 1). These results suggested that HPA accumulation was transient probably because a part of HPA was reduced to 1,3-PD. As expected, HPA was not detected in the supernatant of RF-Glyc80 inoculated with *L. reuteri* 100-23 as well as in RF-Glyc80 samples not inoculated with *L. reuteri*.



**Fig 2. EHEC counts and HPA, 1,3-PD and glycerol quantification in RF-Glyc80.** The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) was co-incubated with *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) in RF samples supplemented with 80 mM glycerol under anaerobiosis. At each time point the strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was enumerated and accumulation of HPA and 1,3-PD, and disappearance of glycerol were monitored. Bars represent the SEM of three independent experiments. Gly: glycerol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.g002>

**Table 1. Concentration of glycerol and microbial metabolites.**

	Acetate (mM) <sup>a</sup>	Propionate (mM) <sup>a</sup>	Butyrate (mM) <sup>a</sup>	Glycerol (mM) <sup>b</sup>	HPA (mM)	1,3-PD (mM)	Lactate (mM)
RF t = 0	61.2 ± 5.5	14.1 ± 1.6	6.3 ± 0.7	-	-	-	-
RF t = 24h	105.3 ± 2.9	33.7 ± 0.8	19.0 ± 1.1	-	-	-	-
RF + LB1-7 t = 24h	95.0 ± 2.4 <sup>NS</sup>	29.9 ± 0.9*	17.5 ± 1.8 <sup>NS</sup>	-	-	-	1.8 ± 0.09
RF-Glyc80 t = 0	61.2 ± 5.5	14.1 ± 1.6	6.3 ± 0.7	82.0 ± 3.5	-	-	-
RF-Glyc80 t = 24h	95.8 ± 4.1 <sup>NS</sup>	40.8 ± 1.6*	26.1 ± 1.7*	61.9 ± 5.8	-	2.6 ± 0.9	0.9 ± 0.35
RF-Glyc80 + LB1-7 t = 24h	79.6 ± 4.8*	17.8 ± 1.1***	7.8 ± 1.2**	34.2 ± 2.1*	7.3 ± 1.7	34.3 ± 2.8	28.7 ± 5.7
RF-Glyc80 + 100–23 t = 24h	ND	ND	ND	46.1 ± 1.9 <sup>NS</sup>	-	3.5 ± 0.5	ND

Concentrations of major ruminal fermentation ends products, glycerol, HPA and 1,3-PD were quantified in RF and RF-Glyc80. The samples were inoculated or not with *L. reuteri* LB1-7. The detection limit of glycerol, 1,3-PD, lactate and HPA were 10<sup>2</sup> mM, 2 x 10<sup>2</sup> mM, 10<sup>2</sup> and 5 x 10<sup>-2</sup> mM, respectively. Means of three independent replicates are shown with their SEM. ND: not determined; -: undetected.

<sup>a</sup>: comparisons were made with RF t = 24h

<sup>b</sup>: comparisons were made with RF-Glyc80 t = 24h

<sup>NS</sup>: P>0.05 (not significant)

\*: P<0.05

\*\* : P<0.01

\*\*\*: P<0.001.

Values with no superscript were not statistically analyzed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.t001>

Because Schaefer *et al.* show that HPA production by *L. reuteri* is stimulated by interaction with different bacteria [8], we investigated the potential stimulating role of EHEC in HPA production. A similar maximal concentration of HPA (≈ 14 mM HPA) was quantified at 8 hours of incubation of RF-Glyc80 co-inoculated with LB1-7 and FCH6 Rif<sup>R</sup> or inoculated with LB1-7 alone demonstrating that the presence of EHEC in RF samples did not stimulate the production of HPA by *L. reuteri* under our experimental conditions.

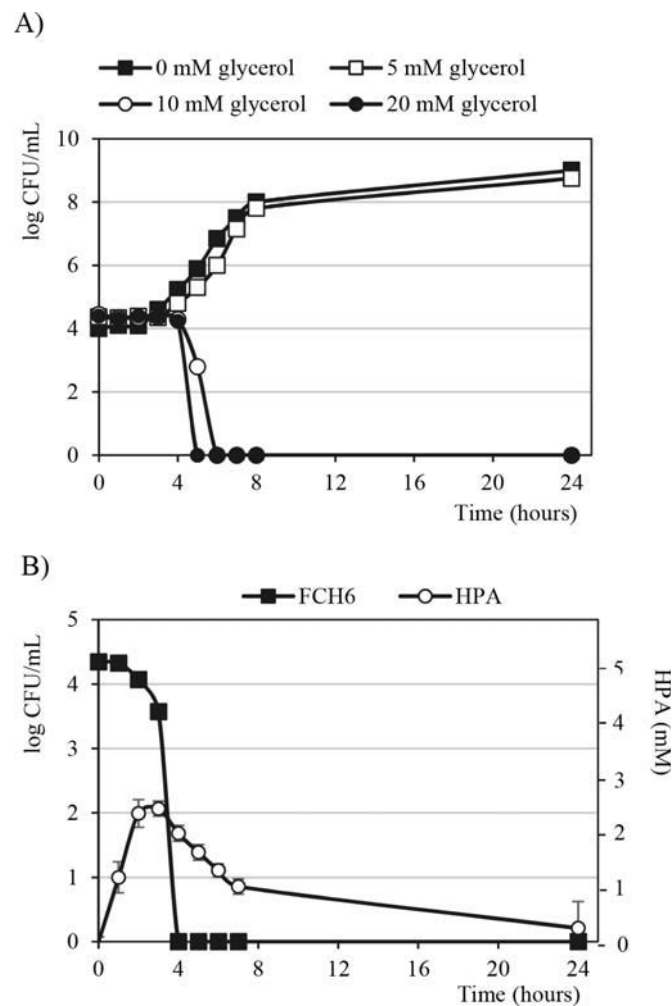
### Production of HPA and antimicrobial activity of *L. reuteri* LB1-7 in LB broth

HPA production and antimicrobial activity of *L. reuteri* LB1-7 against EHEC was also investigated during co-incubation in sterile laboratory medium. As shown in Fig 3A, 10 mM glycerol was required to completely suppress FCH6 Rif<sup>R</sup> co-inoculated with LB1-7 in LB broth after 6 hours of co-incubation. Up to 2.1 mM HPA was produced by *L. reuteri* LB1-7 after 3 hours of co-incubation with FCH6 Rif<sup>R</sup> in LB broth supplemented with 10 mM glycerol (Fig 3B).

Taken together, the results showed that only 10 mM glycerol were required to completely suppress FCH6 Rif<sup>R</sup> in LB medium inoculated with *L. reuteri* LB1-7 while 80 mM glycerol were necessary in RF. Furthermore, it is noteworthy that the HPA concentration produced by *L. reuteri* and apparently sufficient to suppress EHEC was 2.1 and 12.5 mM in LB broth and RF samples, respectively.

### Glycerol metabolism by endogenous rumen microbiota

Fermentation end products were analysed in RF samples. As expected, the three major short-chain fatty acids present in RF samples freshly collected were acetate, propionate and butyrate (RF t = 0, Table 1). The concentration of additional metabolites was below the detection limit: glucose (< 4 x 10<sup>-3</sup> mM), glycerol (< 10<sup>-2</sup> mM), 1,3-PD (< 2 x 10<sup>-2</sup> mM), isobutyrate (< 10<sup>-2</sup> mM), valerate (< 10<sup>-2</sup> mM), lactate (< 10<sup>-2</sup> mM) and ethanol (< 4 x 10<sup>-2</sup> mM). Acetate,



**Fig 3. Kinetics of EHEC growth or disappearance and HPA production in LB broth.** (A) The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> ( $\approx 10^4$  CFU/mL) was co-incubated with *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) in LB broth supplemented or not with different concentration of glycerol. The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was then enumerated after 24 hours of incubation under anaerobiosis. Bacterial growth curves are expressed as a single representation of three independent experiments. (B) The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was co-incubated with *L. reuteri* in LB broth supplemented with 10 mM glycerol under anaerobiosis. At each time point the strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was enumerated and accumulation of HPA was quantified. The bacterial growth curve is expressed as a single representation of three independent experiments. Bars represent the SEM of three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.g003>

propionate and butyrate concentration increased after 24 hours of anaerobic incubation due to fermentation by the endogenous rumen microbiota of simple and complex carbohydrates provided by the ground feed added to RF samples (see the [Materials and Methods](#) section) (RF t = 24h, [Table 1](#)). The glycerol concentration was still  $\approx 62$  mM in RF-Glyc80 after 24 hours of incubation, indicating that the rumen microbiota assimilated  $\approx 24\%$  of the glycerol. In addition, incubation of RF-Glyc80 resulted in an altered fermentation pattern when compared with RF samples not supplemented with glycerol: disappearance of glycerol was associated with an increase in propionate and butyrate concentration ( $P < 0.05$ ) ([Table 1](#)). The 1,3-PD concentration was 2.6 mM in RF-Glyc80 after anaerobic incubation suggesting that the rumen microbiota was able to reduce glycerol to 1,3-PD to some extent. The HPA concentration in RF samples was below the detection limit ( $< 5 \times 10^{-2}$  mM).

## Impact of *L. reuteri* on rumen fermentation and glycerol metabolism

The fermentation pattern of RF-Glyc80 samples inoculated with *L. reuteri* was analyzed (Table 1). After 24 hours of incubation under anaerobiosis, the glycerol concentration was 34.2 mM in RF-Glyc80 inoculated with LB1-7 (Table 1). Comparison with the level of glycerol recovered after incubation of non-inoculated RF-Glyc80 (61.9 mM) suggested that LB1-7 was able to metabolize glycerol, while the change in glycerol concentration in the presence of *L. reuteri* 100–23 was not significant. As expected, HPA was detected in RF-Glyc80 inoculated with LB1-7 but not with 100–23 (Table 1). Furthermore, as shown above, a relatively high concentration of 1,3-PD (34.3 mM) was quantified in RF-Glyc80 inoculated with *L. reuteri* LB1-7 whereas the level of 1,3-PD quantified in RF-Glyc80 inoculated with *L. reuteri* 100–23 was close to that obtained after incubation of RF-Glyc80 alone (Table 1). This suggests that the slight 1,3-PD accumulation observed in RF-Glyc80 inoculated with 100–23 was essentially due to anaerobic reduction of glycerol by the endogenous rumen microbiota. Similar patterns were obtained when RF-Glyc80 was inoculated with *L. reuteri* alone or co-inoculated with both *L. reuteri* and EHEC FCH6 Rif<sup>R</sup>.

In the absence of glycerol, incubation of RF with or without *L. reuteri* led to similar concentrations of acetate and butyrate, and a lower concentration of propionate ( $P < 0.05$ ) (Table 1). In contrast, incubation of *L. reuteri* LB1-7 in RF-Glyc80 led to lower concentrations of acetate ( $P < 0.05$ ), butyrate ( $P < 0.01$ ), and propionate ( $P < 0.001$ ) (Table 1). Noteworthy, lactate accumulation (28.7 mM; 0.13 mM undissociated from) was observed when LB1-7 was inoculated in RF-Glyc80 but not in RF.

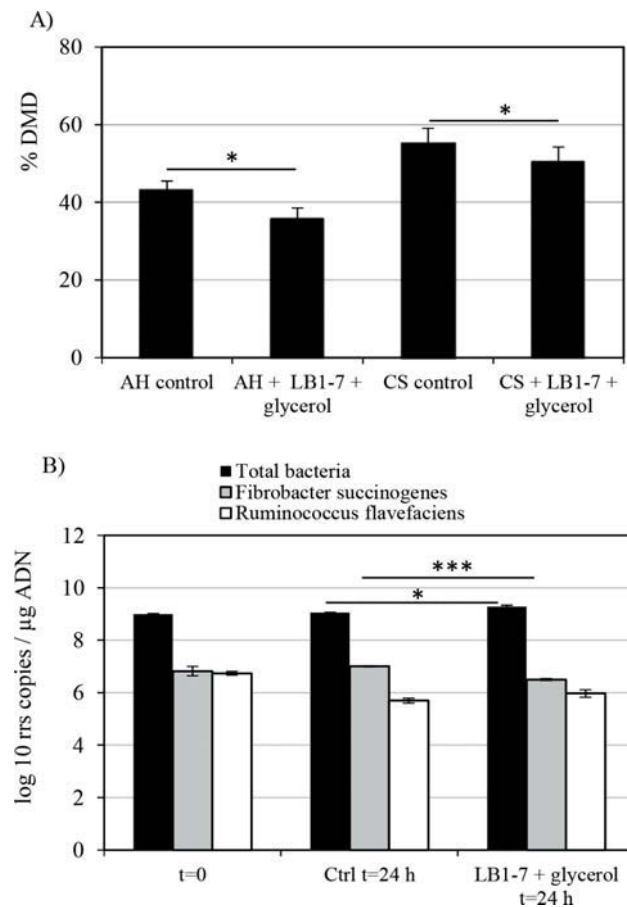
To analyze the role of lactate in EHEC inhibition, the strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was incubated in RF-Glyc80 samples supplemented with 30 mM lactate. After 24 hours of incubation under anaerobiosis, a similar EHEC quantification ( $\approx 10^4$  CFU/mL) was recovered in RF samples supplemented or not with 30 mM lactate suggesting that the LB1-7 bactericidal action was not due to lactate production.

## Impact of *L. reuteri* on the degrading activity of the endogenous rumen microbiota

A potential inhibitory effect of *L. reuteri* on the feedstuff degradation capacity of the rumen microbiota was investigated. After 24 hours of incubation, 55% and 43% of corn silage and alfalfa hay dry matter (DM) respectively, were degraded by the rumen microbiota (Fig 4A). Rumen microbiota activity was confirmed by the production of SCFAs after 24 hours of incubation (S4 Fig). Inoculation of *L. reuteri* LB1-7 and glycerol supplementation (80 mM) resulted in a significant decrease of DM degradation: 50.4% and 35.8% of corn silage and alfalfa hay DM were degraded, respectively ( $P < 0.05$ ) (Fig 4A), corresponding to inhibition decrease of 8.3 and 16.7%. A shift in SCFA profile was also measured (S4 Fig), indicating a disruption in the rumen microbiota. All incubation vessels had the same initial pH (7.10). After 24 hours of incubation, the pH was slightly decreased (6.70) in the vessels inoculated with *L. reuteri* compared with non-inoculated ones (pH 7.05). It is of interest to note that pH 6.70 was still a physiological value for rumen microbiota activity. The decrease in pH value and the fact that lactate and 1,3-PD were recovered in the vessels supplemented with glycerol after 24 hours of LB1-7 incubation (5.2 mM and 7.6 mM, for lactate and 1,3-PD respectively) (S4 Fig) suggested that *L. reuteri* remained metabolically active during the course of fermentation.

In view of these results, a potential antimicrobial activity of *L. reuteri* against the total rumen bacterial population and two major rumen cellulolytic bacteria, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*, was investigated (Fig 4B). After 24 hours of incubation, the total bacterial population was slightly greater ( $P < 0.05$ ) with *L. reuteri* inoculation compared with control. *R. flavefaciens* population decreased during incubation ( $P < 0.05$ ) both in control vessels





**Fig 4. Dry matter degradation (DMD) of forages and fibrolytic ruminal population.** (A) Dry matter degradation of alfalfa hay (AH) and corn silage (CS) by the rumen microbiota after 24 hours of incubation was quantified in the Daisy II incubation system containing RF in the presence or absence of *L. reuteri* LB1-7 and 80 mM glycerol. Non-incubated bags containing forage were used as control (see the experimental procedures section). The data are expressed as the percentage of dry matter degraded. Bars represent the SEM of three independent experiments. (B) Quantification of the *rrs* gene copies of the total rumen bacterial population, *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* in DAISY II vessels. Total DNA template extracted from the Daisy II vessel containing only RF and buffer was used as control (Ctrl). The bacterial populations were quantified before and after 24 hours of incubation. pH was monitored at the start and end of incubation. Bars represent the SEM of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.g004>

and in vessels inoculated with *L. reuteri* and supplemented with glycerol (decrease of 1 and 0.8  $\log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA, respectively) (Fig 4B). The *F. succinogenes* population remained unchanged in the control vessels during the course of the fermentation whereas a significant decrease ( $P < 0.001$ ) was observed in the vessels inoculated with *L. reuteri*. This suggested that *F. succinogenes* was more affected by the presence of *L. reuteri* than *R. flavefaciens*, with on average a decrease of 0.5  $\log_{10}$  *rrs* copy per  $\mu\text{g}$  of DNA compared to control vessels.

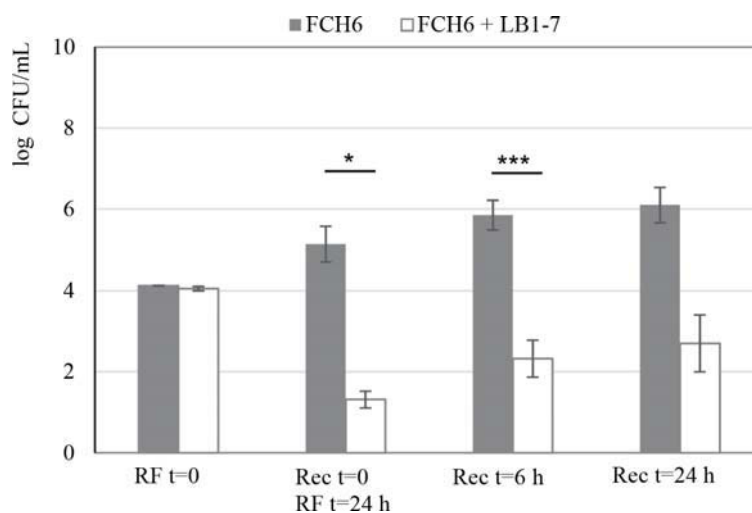
### Survival of EHEC in rectum contents after passage in RF-Glyc80 inoculated with *L. reuteri*

Experiments were performed to mimic the passage of EHEC through different segments of the bovine GIT. To this aim, a first incubation of EHEC was performed in filter-sterilized RF

(FS-RF) samples followed by a second incubation in Rec samples. The fate of FCH6 Rif<sup>R</sup> was evaluated after incubation in FS-RF-Glyc80 with *L. reuteri* LB1-7 and in following Rec samples. The EHEC strain was also incubated in FS-RF without *L. reuteri* and glycerol as a control. A bacterial concentration of 1.3 log<sub>10</sub> FCH6 Rif<sup>R</sup> CFU/mL was recovered after 24 hours of incubation in FS-RF-Glyc80 samples inoculated with *L. reuteri* LB1-7 (Rec t = 0/RF t = 24h, Fig 5). This concentration was markedly lower than that measured in control RF samples (5.1 log<sub>10</sub> CFU/mL, P < 0.05) (Rec t = 0/RF t = 24h, Fig 5). Note that, in contrast to incubation in RF samples containing its endogenous microbiota (Figs 1 and 2), *L. reuteri* LB1-7 strongly repressed but not totally suppressed the growth of EHEC in FS-RF-Glyc80, suggesting that absence of nutritional competition with the ruminal endogenous microbiota is responsible for the better survival of EHEC. In a second step, bacteria that survived passage through the rumen were inoculated in Rec samples containing its endogenous microbiota. Without prior exposure to *L. reuteri* and glycerol in RF, EHEC concentration in Rec samples reached 5.9 and 6.1 log<sub>10</sub> CFU/mL after 6 and 24 hours of incubation respectively (Fig 5). EHEC concentrations were much lower (2.3 and 2.7 log<sub>10</sub> CFU/mL, P < 0.001 and P < 0.10 respectively) after 6 and 24 hours of incubation in Rec samples following preliminary exposure to LB1-7 in FS-RF-Glyc80 (Fig 5). The results demonstrated that the passage of EHEC in RF in the presence of *L. reuteri* and glycerol was efficient to drastically reduce *in vitro* EHEC survival in rectum content.

### Discussion

Strategies can be proposed to reduce the carriage of *E. coli* O157:H7 in cattle i) during the animal growth period in order to limit pathogen shedding and thus environmental burden and ii) just before slaughter to limit the contamination of carcasses and thus the burden of *E. coli* O157:H7 entering the processing plant [30]. Many studies have tested the use of direct fed



**Fig 5. Growth or survival of EHEC in rectum contents after incubation in RF.** The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was first incubated in filter-sterilized RF (FS-RF) samples alone or inoculated with  $\approx 10^7$  CFU/mL of *L. reuteri* LB1-7 supplemented with 80 mM glycerol under anaerobiosis for 24 hours. The bacterial pellet was then inoculated into Rec samples and incubated under anaerobiosis. RF = 0 represents inoculation of EHEC in FS-RF samples; Rec t = 0 corresponds to RF t = 24h i.e. number of EHEC surviving the incubation in FS-RF during 24 hours; Rec t = 6h and Rec t = 24h correspond to EHEC survival in Rec samples after 6 and 24 hours of incubation respectively. Bars represent the SEM of three independent experiments. Effect of *L. reuteri* + Glyc80 is significant \*, P<0.05; \*\*\*, P<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229.g005>

microbials (DFMs) as a pre-harvest strategy to reduce fecal shedding of *E. coli* O157:H7 in beef cattle [31]. Although results of field studies were variable, a recent meta-analysis showed that distribution of lactic acid bacteria appeared efficient in reducing the prevalence of *E. coli* O157:H7 fecal shedding [30].

To our knowledge, the use of *L. reuteri* to reduce EHEC survival in bovine gastrointestinal fluids is investigated for the first time. We have compared several *L. reuteri* strains and selected *L. reuteri* LB1-7 able to convert glycerol to HPA and to suppress EHEC in RF containing metabolically active endogenous microbiota. *L. reuteri* LB1-7 appeared to be of particular interest because of its resistance to simulated gastric and intestinal conditions [17], in addition, it can be potentially endowed with probiotic activities as already demonstrated for other lactobacilli isolated from raw milk [32]. Furthermore, in *in vitro* simulation of EHEC fate along the bovine digestive tract, we showed that when the EHEC strain are exposed to *L. reuteri* and glycerol in rumen fluid, its viable load sharply decreased, affecting also EHEC viability in a posterior digestive compartment (*i.e.* the rectum).

The rumen environment should be appropriate for HPA production by *L. reuteri* because it is strictly anaerobic and the concentration of available sugars has been reported to be generally low (<1–2 mM post feeding [33]), a required condition for anaerobic glycerol fermentation by *L. reuteri* (a low glucose concentration favours HPA instead of 1,3-PD accumulation [34]). Indeed, the soluble carbohydrates resulting from polysaccharide breakdown by rumen microbiota are either readily fermented or very rapidly sequestered under the form of oligosaccharides into the cells, preventing soluble sugars to be released in RF [35]. The rumen microbiota is able to produce low levels of 1,3-PD in RF-Glyc80 suggesting transient HPA accumulation. This indicates that some bacteria of the rumen microbiota possess the metabolic pathways to convert glycerol to 1,3-PD via HPA reduction. Among 1,3-PD-producers, *Clostridium butyricum* and *C. perfringens* are the most commonly reported mammal intestinal species [36]. Although 1,3-PD production is not described in the rumen of cattle, we speculate that members of the *Clostridium* genus, which belong to the core ruminal bacterial community [37], could be responsible for HPA production in RF-Glyc80. However, RF-Glyc80 alone was not effective in preventing EHEC multiplication suggesting that transient HPA produced by the endogenous microbiota was insufficient to achieve an antimicrobial effect.

As expected, the acetate:propionate ratio decreased in RF-Glyc80 after 24 hours of incubation indicating that part of the glycerol was fermented by the rumen microbiota. Several ruminal bacterial species such as *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantium* are able to ferment glycerol into propionate [38–40]. However, incubation of *L. reuteri* in RF-Glyc80 resulted in decrease in propionate concentration suggesting that part of the glycerol that could be fermented to propionate by the ruminal microbiota was more efficiently metabolized by *L. reuteri*. It can also be hypothesized that the HPA produced by *L. reuteri* in RF-Glyc80 resulted in an inhibition of the propionate producing population.

One of the main functions of the rumen microbiota is the degradation and fermentation of plant biomass into short chain fatty acids providing energy for the animal [41]. Therefore, it is important to analyze the effects of LB1-7 inoculation on the degrading activity of the rumen microbiota. In our study, a significant decrease in corn silage and alfalfa hay degradation in the presence of *L. reuteri* LB1-7 and glycerol was observed. This decrease is probably due to an inhibitory effect of HPA on the rumen fibrolytic populations, as observed for *F. succinogenes*. However, qPCR assay targeting bacterial DNA, as well as DM degradation quantification could lead to underestimation of the effect of *L. reuteri* on the rumen bacteria, due to contribution of DNA and active enzymes released by dead bacterial cells. Fermentation end-products profiles also suggested that *L. reuteri* exerted an antimicrobial activity against the rumen endogenous microbiota in the presence of glycerol. In addition to the effect on fibrolytic

populations, production of HPA by *L. reuteri* may lead to inhibition of lactate-utilizing and butyrate- and propionate-producing rumen bacteria, resulting in perturbed fermentations. Consequently, a potential supplementation of *L. reuteri* and glycerol during the animal growing period appears to be unsuitable. However, since EHEC carriage at the time of slaughter represents the potential entry of the pathogen into the meat production process, administration of *L. reuteri* and glycerol could be considered in view of application to finishing beef cattle, a few days before slaughter, when performance goals (decreased rate of gain—finished weight) are achieved. However, the pre-slaughter glycerol and *L. reuteri* administration should avoid additional stressing factors that may have a negative impact on meat quality [42]. Therefore, the approach we suggest for reducing *E. coli* shedding by cattle needs to be carefully evaluated to assess the stress responses in living animal and in post-mortem muscle metabolism, in addition to killing activity against EHEC.

Accumulation of lactate was observed in RF-Glyc80 after incubation of *L. reuteri* under anaerobiosis. The efficiency of lactate in inhibiting *E. coli* O157:H7 multiplication in food products and cattle hides is well documented [43, 44]. Furthermore, Ogawa *et al.* showed that the bactericidal activity of *L. casei* against *E. coli* O157:H7 was due to production of undissociated lactate, which permeates the bacterial membrane by diffusion and releases protons into the cell [26]. Our data clearly showed that lactate was not involved in EHEC suppression in rumen contents, probably because the weak level of the corresponding undissociated form was below the minimal inhibitory concentration [26]. Nonetheless, it is possible that the distribution of glycerol and *L. reuteri* to ruminants leads to EHEC inhibition due to HPA as well as lactate production in the rumen. In further steps, it will be important to analyze the impact of *L. reuteri* and glycerol association *in vivo*, in order to assess their effects on bovine gastrointestinal health due to lactate production and microbiota disruption.

The potential use of *L. reuteri* as a feed supplement to reduce EHEC burden in cattle would necessarily be associated with glycerol administration. It is generally admitted that supplementing feed with a formulation containing freeze-dried micro-organisms is easy to implement, as far as strains stability issues are resolved. Introduction of *L. reuteri* as direct-fed microbial (DFM) would be of interest because the use of DFMs is widely accepted in ruminant nutrition and is perceived as a natural non-antibiotic way of improving animal performance and health [45]. The use of glycerol as cattle feed supplement has already been proposed to improve animal performance because of its cost-effective energetic value. Because the energy content of glycerol is close to that of corn, the replacement of corn by dry glycerol in cows daily supplementation has been considered [46]. Furthermore, the glycerol concentrations needed for EHEC inhibition by *L. reuteri in vitro* are close to those used in cattle production [46, 47]. However, *in vivo* experiments will be needed to determine the glycerol concentration required for production of sufficient HPA to suppress EHEC in the rumen of cows, as part of the glycerol might be absorbed across the rumen wall [48].

In conclusion, *L. reuteri* LB1-7 appeared to resist the physical and microbiological conditions encountered in the rumen of cows and was effective in suppressing EHEC O157:H7 in RF *in vitro*. Data presented in this report define valuable information on the optimal antagonistic effect of a selected *L. reuteri* strain against EHEC (*L. reuteri*-EHEC concentration ratio, glycerol level, aeration conditions) and provide helpful data to set up more targeted *in vivo* trials to assess the efficiency of *L. reuteri* to decrease EHEC shedding by cattle. Future studies will be required to determine i) DFM supplementation parameters, ii) the effect of *L. reuteri* and glycerol on rumen microbiota and iii) the survival of EHEC strains in lower gastrointestinal tract. *In vivo* studies will also be necessary to explore the potential of HPA-producing *L. reuteri* alone or in combination with already commercialized DFMs in order to ultimately validate an efficient pre-harvest strategy in beef cattle with the aim to improve food safety.

## Supporting information

**S1 Fig. Survival of EHEC strains in RF samples.** The strains FCH6 Rif<sup>R</sup> and EDL933 Rif<sup>R</sup> were incubated in RF samples for 24 hours under anaerobiosis before enumeration. Bars represent the SEM of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ).  
(TIF)

**S2 Fig. Agar spot assays of *L. reuteri* strains.** *L. reuteri* strains (LB1-7, F275, 65-A, F70 and 100–23) were first spotted onto the surface of Brain Heart Infusion (BHI) agar supplemented with 20 mM glucose and incubated anaerobically. The EHEC strain FCH6 was then inoculated in soft agar with or without glycerol (2%) and poured over the *L. reuteri* spots (in order to facilitate or not HPA production by spots containing *L. reuteri*). The plates were then incubated and the antimicrobial activity was recorded as growth-free inhibition zones around the spots as previously described [20].  
(TIF)

**S3 Fig. Amplification of DNA extracted from *L. reuteri* strains.** PCR detection of the genes *gldC* (A) and *dhaT* (B) from genomic DNA extracted from *L. reuteri* strains. Lane 1, molecular size marker (MassRuler DNA Ladder, ThermoFisher Scientific); lane 2, *L. reuteri* LB1-7; lane 3, *L. reuteri* 65A; lane 4, *L. reuteri* F70; lane 5, *L. reuteri* F275; line 6, *L. reuteri* 100–23. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.  
(TIF)

**S4 Fig. Fermentation end-products in Daisy II experiments.** The Daisy II method was used to analyze the degrading activity of the rumen microbiota. The Daisy II vessels containing RF were supplemented or not with 80 mM glycerol and inoculated or not with *L. reuteri* LB1-7. The fermentation end-products were quantified in Daisy II vessels before and after 24 hours of anaerobic incubation. Bars represent the SEM of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ).  
ACE: acetate; PROP: propionate; BUTY: butyrate; GLY: glycerol; LACT: lactate.  
(TIF)

**S5 Fig. Growth or survival of EHEC in samples collected from the rectum of cows.** The strain FCH6 Rif<sup>R</sup> was incubated under anaerobiosis in Rec samples or co-incubated in Rec samples inoculated with *L. reuteri* LB1-7 ( $\approx 10^7$  CFU/mL) and supplemented with 80 mM glycerol. Bars represent the SEM of three independent experiments. Effect of *L. reuteri* + Glyc80 is significant \*,  $P < 0.05$ .  
(TIF)

### S1 Table. Bacterial strains used in this study.

<sup>a</sup>: DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

<sup>b</sup>: ISPA, Institute of Sciences of Food Production microbial collection number; National Research Council, Italy.  
(DOCX)

**S2 Table. Oligonucleotides used in this study.** DNA sequences from *L. reuteri* available in DNA databases (JCM 1112 [AP007282.1], DSM 20016 [CP000705.1], FUA3400 [KJ435307.1], SD2112 [CP002844.1], BR11 [GU191838.1] and BPL36 [JQ897939.1]) were aligned (Align Sequences Nucleotide BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>]) to design the primer pairs used to

amplify *gldC* and *dhaT*.  
(DOCX)

**S3 Table. EHEC inhibition in the presence of *L. reuteri* and glycerol.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

We thank Gregory Jubelin and Silvia de Candia for critical reading of the manuscript, and Aurélie Ameilbonne for excellent technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Yolande Bertin, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

**Funding acquisition:** Evelyne Forano.

**Investigation:** Chloé Habouzit, Lysiane Dunière, Marie Laurier, Alexandra Durand, David Duchez, Audrey Segura, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

**Methodology:** Yolande Bertin, Chloé Habouzit, Lysiane Dunière, Marie Laurier, Frédérique Chaucheyras-Durand.

**Project administration:** Evelyne Forano.

**Resources:** Yolande Bertin, Chloé Habouzit, Lysiane Dunière, Marie Laurier, Alexandra Durand, Delphine Thévenot-Sergentet, Federico Baruzzi, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

**Supervision:** Yolande Bertin, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

**Writing – original draft:** Yolande Bertin, Lysiane Dunière, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

**Writing – review & editing:** Yolande Bertin, Lysiane Dunière, Alexandra Durand, Audrey Segura, Delphine Thévenot-Sergentet, Federico Baruzzi, Frédérique Chaucheyras-Durand, Evelyne Forano.

## References

1. Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88:729–745. PMID: [10792533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10792533/)
2. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*. 2005; 36:289–311. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005002> PMID: [15845227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845227/)
3. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 141 Suppl 1:S15–S28.
4. Pandey V, Berwal V, Solanki N, Malik NS. Probiotics: Healthy bugs and nourishing elements of diet. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2015; 5:81–87.
5. Bøhle LA, Brede DA, Diep DB, Holo H, Nes IF. Specific degradation of the mucus adhesion-promoting protein (MapA) of *Lactobacillus reuteri* to an antimicrobial peptide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76:7306–7309. <https://doi.org/10.1128/AEM.01423-10> PMID: [20833791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833791/)
6. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989; 33:674–679. PMID: [2751282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2751282/)
7. Vollenweider S, Evers S, Zurbriggen K, Lacroix C. Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58:10315–10322. <https://doi.org/10.1021/jf1010897> PMID: [20845960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20845960/)

8. Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*; 2010. 156:1589–1599. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035642-0> PMID: 20150236
9. Lüthi-Peng Q, Schärer S, Puhán Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002; 60:73–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1099-0> PMID: 12382044
10. Vollenweider S, Grassi G, König I, Puhán Z. Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51:3287–3293. <https://doi.org/10.1021/jf021086d> PMID: 12744656
11. Eaton KA, Honkala A, Auchtung TA, Britton RA. Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. *Infection and Immunity*. 2011; 79:185–191. <https://doi.org/10.1128/IAI.00880-10> PMID: 20974822
12. Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, et al. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*. 2003; 71:1505–1512. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1505-1512.2003> PMID: 12595469
13. Brown C, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63:27–32. PMID: 8979335
14. Keen JE, Laegreid WW, Chitko-McKown CG, Durso LM, Bono JL. Distribution of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76:5278–5281. <https://doi.org/10.1128/AEM.00400-10> PMID: 20543036
15. Walker C, Shi X, Sanderson M, Sargeant J, Nagaraja TG. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gut contents of beef cattle at slaughter. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010; 7:249–255. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0410> PMID: 19899963
16. Sperandio V. SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 in the bovine rumen. *Gut Microbes*. 2010; 1:432–435. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.6.14177> PMID: 21468228
17. Baruzzi F, Poltronieri P, Quero GM, Morea M, Morelli L. An *in vitro* protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90:331–342 <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3133-6> PMID: 21318359
18. Chaucheyras-Durand F, Madic J, Doudin F, Martin C. Biotic and abiotic factors influencing *in vitro* growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:4136–4142. <https://doi.org/10.1128/AEM.02600-05> PMID: 16751525
19. Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, et al. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *Environmental Microbiology*. 2013; 15:610–622. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12019> PMID: 23126484
20. Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008; 14:166–171. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001> PMID: 18396068
21. Stern MD, Bach A, Calsamiglia S. Alternative techniques for measuring digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*. 1997; 75:2256–2276. PMID: 9263075
22. Adesogan AT. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy II incubators. *Animal Feed Science and Technology*. 2005; 119:333–334.
23. Damiran D, Del Curto T, Bohnert DW, Findhol SL. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2008; 141:15–35.
24. Goering HK, Van Soest PJ. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). *Agri Handbook No. 379*. ARSUSDA, Washington, DC. 1970.
25. Bertin Y, Deval C, de la Foye A, Masson L, Gannon V, Harel J, et al. The gluconeogenesis pathway is involved in maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *PLoS One*. 2014; 9:e98367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098367> PMID: 24887187
26. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, et al. 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*. 2001; 68:135–140. PMID: 11545213
27. Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Béra-Maillet C, Forano E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 103:2676–2685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03517.x> PMID: 18045448

28. Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:114–23. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.114-123.2002> PMID: 11772617
29. Rivas L, Coffey B, McAuliffe O, McDonnell MJ, Burgess CM, Coffey A, et al. *In vivo* and *ex vivo* evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010; 76:7210–7216. <https://doi.org/10.1128/AEM.01530-10> PMID: 20851992
30. Wisener LV, Sargeant JM, O'Connor AM, Faires MC, Glass-Kaasta SK. The use of direct-fed microbials to reduce shedding of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses and Public Health.* 2015; 62:75–89. <https://doi.org/10.1111/zph.12112> PMID: 24751204
31. Brashears MM, Chaves BD. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. *Meat Sci.* 2017; S0309-1740(17)30213-30219.
32. Luongo D, Miyamoto J, Bergamo P, Nazzaro F, Baruzzi F, Sashihara T, et al. Differential modulation of innate immunity *in vitro* by probiotic strains of *Lactobacillus gasseri*. *BMC Microbiology.* 2013; 13:298. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-298> PMID: 24365457
33. McSweeney S, Mackie RI. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. FAO Background study paper N° 61. 2012.
34. Vaidyanathan H, Kandasamy V, Ramakrishnan GG, Ramachandran KB, Jayaraman G, Ramalingam S. Glycerol conversion to 1, 3-Propanediol is enhanced by the expression of a heterologous alcohol dehydrogenase gene in *Lactobacillus reuteri*. *AMB Express.* 1–37.
35. White BA, Lamed R, Bayer EA, Flint HJ. Biomass utilization by gut microbiomes. *Annual Review of Microbiology.* 2014; 68:279–96. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155618> PMID: 25002092
36. Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1999; 52:289–297. PMID: 10531640
37. Jami E, Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One.* 2012; 7:e33306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033306> PMID: 22432013
38. Garton GA, Lough AK, Vioque E. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *Journal of General Microbiology.* 1961; 25:215–225. <https://doi.org/10.1099/00221287-25-2-215> PMID: 13703779
39. Danielsson R, Werner-Omazic A, Ramin M, Schnürer A, Griinari M, Dicksved J, et al. Effects on enteric methane production and bacterial and archaeal communities by the addition of cashew nut shell extract or glycerol—an *in vitro* evaluation. *Journal of Dairy Science.* 2014; 97:5729–5741. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7929> PMID: 24996274
40. Hobson PN, Mann SO. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Journal of General Microbiology.* 1961; 25:227–240. <https://doi.org/10.1099/00221287-25-2-227> PMID: 13714763
41. Hoover WH, Miller TK. Rumen digestive physiology and microbial ecology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 1991; 7:311–325.
42. Gruber SL, Tatum JD, Engle TE, Chapman PL, Belk KE, Smith GC. Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef longissimus muscle tenderness. *Journal of Animal Science.* 2010; 88:1148–1159. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2183> PMID: 19897634
43. Elramady MG, Aly SS, Rossitto PV, Crook JA, Cullor JS. Synergistic effects of lactic acid and sodium dodecyl sulfate to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on cattle hide sections. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2013; 10:661–663. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1420> PMID: 23594235
44. Chancey CC, Brooks JC, Martin JN, Echeverry A, Jackson SP, Thompson LD, et al. Survivability of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically tenderized beef steaks subjected to lactic acid application and cooking under simulated industry conditions. *Journal of Food Protection.* 2013; 76:1778–1783. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-566> PMID: 24112580
45. Chaucheyras-Durand F, Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 2010; 1:3–9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002> PMID: 21840795
46. Donkin SS, Koser SL, White M, Doane H, Cecava MJ. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 2009; 92:5111–5119. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2201> PMID: 19762829
47. Lomander H, Frössling J, Ingvarsen KL, Gustafsson H, Svensson C. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation—effects on metabolic status, body condition, and milk yield. *Journal of Dairy Science.* 2012; 95: 2397–2408. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4535> PMID: 22541468
48. Rémond D, Chaise JP, Delval E, Poncet C. Net flux of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with orchardgrass hay. *Journal of Animal Sciences.* 1993; 71:2529–2538.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Adhikari, P., Berish, S. A., Nowalk, A. J., Veraldi, K. L., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (1996). The *fbpABC* locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *J Bacteriol*, *178*(7), 2145-2149.
- AFSSA. (2003). (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC).
- AFSSA. (2008). (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). Avis relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shiga-toxines considérées comme pathogènes pour l'homme.
- AFSSA. (2010). (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). Avis relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008.
- Akiba, M., Sameshima, T., & Nakazawa, M. (2000). Clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected cattle. *FEMS Microbiol Lett*, *184*(1), 79-83.
- Amaretti, A., Tamburini, E., Bernardi, T., Pompei, A., Zanoni, S., Vaccari, G., . . . Rossi, M. (2006). Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, *73*(3), 654-662. doi: 10.1007/s00253-006-0500-9
- Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010). Accessed 10 Nov 2016.
- Anonymous. (2000). Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep*, *26*(20), 170-173.
- Anonymous. (2011). Dog show sparks new Swedish EHEC outbreak. *The Local*. from <https://www.thelocal.se/20110616/34384>
- ANSES. (2010). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la révision de la définition des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) majeurs typiques, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés, et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les aliments. Maison-Alfort.
- ANSES. (2017a). Avis de l'Agence nationale sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine.
- ANSES. (2017b). Les *Escherichia coli* entéhémorragiques (EHEC) - Connaitre la bactérie pour éviter les intoxications. from <https://www.anses.fr/fr/glossaire/733>
- Aperce, C. C., Heidenreich, J. M., & Drouillard, J. S. (2014). Capacity of the bovine intestinal mucus and its components to support growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Animal*, *8*(5), 731-737. doi: 10.1017/S1751731114000147
- Arthur, T. M., Barkocy-Gallagher, G. A., Rivera-Betancourt, M., & Koohmaraie, M. (2002). Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Environ Microbiol*, *68*(10), 4847-4852.
- Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., . . . Koohmaraie, M. (2004). *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J Food Prot*, *67*(4), 658-665.
- Arthur, T. M., Brichta-Harhay, D. M., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2010). Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. *Meat Sci*, *86*(1), 32-37. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.019
- Arthur, T. M., Keen, J. E., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., . . . Koohmaraie, M. (2009). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Appl Environ Microbiol*, *75*(20), 6515-6523. doi: 10.1128/AEM.00081-09

- Arthur, T. M., Nou, X., Kalchayanand, N., Bosilevac, J. M., Wheeler, T., & Koohmaraie, M. (2011). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on cattle hides. *Appl Environ Microbiol*, 77(9), 3002-3008. doi: 10.1128/AEM.02238-10
- Auvray, F., Dilasser, F., Bibbal, D., Kerouredan, M., Oswald, E., & Brugere, H. (2012). French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4. *Vet Microbiol*, 158(3-4), 443-445. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.029
- Avery, L. M., Killham, K., & Jones, D. L. (2005). Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *J Appl Microbiol*, 98(4), 814-822. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02524.x
- Bach, S. J., McAllister, T. A., Veira, D. M., Gannon, V. P. J., & Holley, R. A. (2002). Transmission and control of *Escherichia coli* O157:H7 - A review. *Canadian Journal of animal science*.
- Bach, S. J., McAllister, T. A., Veira, D. M., Gannon, V. P. J., & Holley, R. A. (2003). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol*, 104, 179-189.
- Baehler, A. A., & Moxley, R. A. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 induces attaching-effacing lesions in large intestinal mucosal explants from adult cattle. *FEMS Microbiol Lett*, 185(2), 239-242.
- Baker, D. R., Moxley, R. A., & Francis, D. H. (1997). Variation in virulence in the gnotobiotic pig model of O157:H7 *Escherichia coli* strains of bovine and human origin. *Adv Exp Med Biol*, 412, 53-58.
- Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun*, 75(9), 4597-4607. doi: 10.1128/IAI.00630-07
- Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., Siragusa, G. R., Keen, J. E., Elder, R. O., Laegreid, W. W., & Koohmaraie, M. (2001). Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. *Appl Environ Microbiol*, 67(9), 3810-3818.
- Barnett Foster, D., Abul-Milh, M., Huesca, M., & Lingwood, C. A. (2000). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induces apoptosis which augments bacterial binding and phosphatidylethanolamine exposure on the plasma membrane outer leaflet. *Infect Immun*, 68(6), 3108-3115.
- Batisson, I., Guimond, M. P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., . . . Harel, J. (2003). Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 71(8), 4516-4525.
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 65, 189-213. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946
- Bauwens, A., Betz, J., Meisen, I., Kemper, B., Karch, H., & Muthing, J. (2013). Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cell Mol Life Sci*, 70(3), 425-457. doi: 10.1007/s00018-012-1060-z
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 249-289.
- Bentancor, L. V., Bilen, M., Brando, R. J., Ramos, M. V., Ferreira, L. C., Ghiringhelli, P. D., & Palermo, M. S. (2009). A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. *Clin Vaccine Immunol*, 16(5), 712-718. doi: 10.1128/CI.00328-08
- Berger, C. N., Crepin, V. F., Baruch, K., Mousnier, A., Rosenshine, I., & Frankel, G. (2012). EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *MBio*, 3(5). doi: 10.1128/mBio.00317-12
- Berry, E. D., & Wells, J. E. (2010). *Escherichia coli* O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Adv Food Nutr Res*, 60, 67-117.
- Bertin, Y., Chaucheyras-Durand, F., Robbe-Masselot, C., Durand, A., de la Foye, A., Harel, J., . . . Martin, C. (2013a). Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

- in bovine intestinal content. *Environ Microbiol*, 15(2), 610-622. doi: 10.1111/1462-2920.12019
- Bertin, Y., Deval, C., de la Foye, A., Masson, L., Gannon, V., Harel, J., . . . Forano, E. (2014). The gluconeogenesis pathway is involved in maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine intestinal content. *PLoS One*, 9(6), e98367. doi: 10.1371/journal.pone.0098367
- Bertin, Y., & Forano, E. (2013b). Sécurité microbiologique de la viande de boeuf. *Viandes & Produits Carnés, VPC-2013-30-1-4*.
- Bertin, Y., Girardeau, J. P., Chaucheyras-Durand, F., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Harel, J., & Martin, C. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ Microbiol*, 13(2), 365-377. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02334.x
- Bertin, Y., Habouzit, C., Dunière, L., Laurier, M., Durand, A., Duchez, D., . . . Forano, E. (2017). *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety? *PLoS One*, 12(11), e0187229. doi: 10.1371/journal.pone.0187229
- Besser, T. E., Hancock, D. D., Pritchett, L. C., McRae, E. M., Rice, D. H., & Tarr, P. I. (1997). Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis*, 175(3), 726-729.
- Besser, T. E., Richards, B. L., Rice, D. H., & Hancock, D. D. (2001). *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect*, 127(3), 555-560.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouredan, M., Ferre, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., . . . Brugere, H. (2015). Prevalence of carriage of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol*, 81(4), 1397-1405. doi: 10.1128/AEM.03315-14
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., & Karch, H. (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int J Med Microbiol*, 304(5-6), 521-529. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.05.005
- Bielaszewska, M., Idelevich, E. A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., . . . Karch, H. (2012). Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6), 3277-3282. doi: 10.1128/AAC.06315-11
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., . . . Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, 11(9), 671-676. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*, 2012, 681473. doi: 10.1155/2012/681473
- Bishop, R. E., Leskiw, B. K., Hodges, R. S., Kay, C. M., & Weiner, J. H. (1998). The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J Mol Biol*, 280(4), 583-596. doi: 10.1006/jmbi.1998.1894
- Bolton, D. J., Byrne, C. M., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., & Blair, I. S. (1999). The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*, 86(3), 407-411.
- Booher, S. L., Cornick, N. A., & Moon, H. W. (2002). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Vet Microbiol*, 89(1), 69-81.
- Borirak, O., Rolfe, M. D., de Koning, L. J., Hoefsloot, H. C., Bekker, M., Dekker, H. L., . . . Hellingwerf, K. J. (2015). Time-series analysis of the transcriptome and proteome of *Escherichia coli* upon glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, 1854(10 Pt A), 1269-1279. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.05.017

- Brandal, L. T., Sekse, C., Lindstedt, B. A., Sunde, M., Lobersli, I., Urdahl, A. M., & Kapperud, G. (2012). Norwegian sheep are an important reservoir for human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol*, 78(12), 4083-4091. doi: 10.1128/AEM.00186-12
- Brashears, M. M., Galyean, M. L., Loneragan, G. H., Mann, J. E., & Killinger-Mann, K. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot*, 66(5), 748-754.
- 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(8), 1422-1429. doi: 10.1086/466536
- Brown, C. A., Harmon, B. G., Zhao, T., & Doyle, M. P. (1997). Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol*, 63(1), 27-32.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., Lefevre, S., Bonacorsi, S., Van Cauteren, D., . . . le réseau des néphrologues pédiatres. (2016). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez l'enfant de moins de 15 ans. Santé publique France. *Santé publique France*.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Gouali, M., Le Hello, S., Van Cauteren, D., . . . le réseau des néphrologues pédiatres. (2015). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2015. Santé publique France.
- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin Lab Med*, 35(2), 247-272. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.004
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F. D., . . . Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*, 193(12), 883-891. doi: 10.1007/s00203-011-0725-6
- Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., & Delgado, M. J. (2012). Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. *Antioxid Redox Signal*, 16(8), 819-852. doi: 10.1089/ars.2011.4051
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N. T., Plunkett, G., Sofia, H. J., & Blattner, F. R. (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res*, 26(18), 4196-4204.
- Busch, U., Hormansdorfer, S., Schraner, S., Huber, I., Bogner, K. H., & Sing, A. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* excretion by child and her cat. *Emerg Infect Dis*, 13(2), 348-349. doi: 10.3201/eid1302.061106
- Buvs, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Lauwers, S., & Pierard, D. (2010). Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and first description of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase in serogroup O26. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11), 4907-4909. doi: 10.1128/AAC.00551-10
- Caceres, M. E., Etcheverria, A. I., Fernandez, D., Rodriguez, E. M., & Padola, N. L. (2017). Variation in the distribution of putative virulence and colonization factors in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from different categories of cattle. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 147. doi: 10.3389/fcimb.2017.00147
- Callaway, T. R., Carr, M. A., Edrington, T. S., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2009). Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol*, 11(2), 67-79.
- Campellone, K. G., Robbins, D., & Leong, J. M. (2004). EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell*, 7(2), 217-228. doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.004
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*, 36(3), 289-311. doi: 10.1051/vetres:2005002
- Carter, M. Q., Parker, C. T., Louie, J. W., Huynh, S., Fagerquist, C. K., & Mandrell, R. E. (2012). RcsB contributes to the distinct stress fitness among *Escherichia coli* O157:H7 curli variants of the

- 1993 hamburger-associated outbreak strains. *Appl Environ Microbiol*, 78(21), 7706-7719. doi: 10.1128/AEM.02157-12
- CDC. (2016). (Center for Disease Control and Prevention). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). from <https://www.cdc.gov/foodnet/about.html>
- CDC. (2017). (Center for Disease Control and Prevention). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). from <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/>
- Chalmers, R. M., Salmon, R. L., Willshaw, G. A., Cheasty, T., Looker, N., Davies, I., & Wray, C. (1997). Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet*, 349(9068), 1816.
- Chang, D. E., Smalley, D. J., Tucker, D. L., Leatham, M. P., Norris, W. E., Stevenson, S. J., . . . Conway, T. (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7427-7432. doi: 10.1073/pnas.0307888101
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., & Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol*, 6(12), 904-912. doi: 10.1038/nrmicro2029
- Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2010a). Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes*, 1(1), 3-9. doi: 10.3920/BM2008.1002
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C., & Martin, C. (2010b). Fates of acid-resistant and non-acid-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl Environ Microbiol*, 76(3), 640-647. doi: 10.1128/AEM.02054-09
- Chaucheyras-Durand, F., Madic, J., Doudin, F., & Martin, C. (2006). Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 4136-4142. doi: 10.1128/AEM.02600-05
- Chekabab, S. M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C. M., & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*, 341(1), 1-12. doi: 10.1111/1574-6968.12078
- Cheng, H. Y., Soo, V. W., Islam, S., McAnulty, M. J., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2014). Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ Microbiol*, 16(6), 1741-1754. doi: 10.1111/1462-2920.12373
- Chin, N., Frey, J., Chang, C. F., & Chang, Y. F. (1996). Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*, 143(1), 1-6.
- Choi, W., Yamaguchi, Y., Lee, J. W., Jang, K. M., Inouye, M., Kim, S. G., . . . Park, J. H. (2017). Translation-dependent mRNA cleavage by YhaV in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 591(13), 1853-1861. doi: 10.1002/1873-3468.12705
- Chong, Y., Fitzhenry, R., Heuschkel, R., Torrente, F., Frankel, G., & 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(Pt 3), 794-802. doi: 10.1099/mic.0.2006/003178-0
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66(10), 4555-4558.
- Cobbold, R., & Desmarchelier, P. (2002). Horizontal transmission of shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Appl Environ Microbiol*, 68(8), 4148-4152.
- Cobbold, R. N., Hancock, D. D., Rice, D. H., Berg, J., Stilborn, R., Hovde, C. J., & Besser, T. E. (2007). Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics. *Appl Environ Microbiol*, 73(5), 1563-1568. doi: 10.1128/AEM.01742-06
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., . . . Tiedje, J. M. (2009). The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D141-145. doi: 10.1093/nar/gkn879

- Conway, T., & Cohen, P. S. (2015). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiol Spectr*, 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014
- Conway, T., Krogfelt, K. A., & Cohen, P. S. (2004). The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. *EcoSal Plus*, 1(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.3.1.2
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B., & Karmali, M. A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 74(7), 2153-2160. doi: 10.1128/AEM.02566-07
- Cordonnier, C., Etienne-Mesmin, L., Thevenot, J., Rougeron, A., Renier, S., Chassaing, B., . . . Livrelli, V. (2017a). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Sci Rep*, 7, 44655. doi: 10.1038/srep44655
- Cordonnier, C., Le Bihan, G., Emond-Rheault, J. G., Garrivier, A., Harel, J., & Jubelin, G. (2016). Vitamin B12 uptake by the gut commensal bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* limits the production of shiga toxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)*, 8(1). doi: 10.3390/toxins8010014
- Cordonnier, C., Thevenot, J., Etienne-Mesmin, L., Alric, M., Livrelli, V., & Blanquet-Diot, S. (2017b). Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: An effective strategy against a deadly enemy? *Crit Rev Microbiol*, 43(1), 116-132. doi: 10.1080/1040841X.2016.1185602
- Cornick, N. A., Booher, S. L., & Moon, H. W. (2002). Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun*, 70(5), 2704-2707.
- Cornick, N. A., Matise, I., Samuel, J. E., Bosworth, B. T., & Moon, H. W. (1999). Edema disease as a model for systemic disease induced by Shiga toxin-producing *E. coli*. *Adv Exp Med Biol*, 473, 155-161.
- Cowden, J. M., & Christie, P. (1997). Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157. *Health Bull (Edinb)*, 55(1), 9-10.
- CPAN. from [http://search.cpan.org/dist/BioPerl/scripts/Bio-DB-GFF/bp\\_genbank2gff3.pl](http://search.cpan.org/dist/BioPerl/scripts/Bio-DB-GFF/bp_genbank2gff3.pl). Assessed 15 Oct 2016.
- Cray, W. C., Jr., & Moon, H. W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 61(4), 1586-1590.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 8(1), 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), 822-880. doi: 10.1128/CMR.00022-13
- Cull, C. A., Paddock, Z. D., Nagaraja, T. G., Bello, N. M., Babcock, A. H., & Renter, D. G. (2012). Efficacy of a vaccine and a direct-fed microbial against fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a randomized pen-level field trial of commercial feedlot cattle. *Vaccine*, 30(43), 6210-6215. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.080
- Dargatz, D. A., Bai, J., Lubbers, B. V., Koprak, C. A., An, B., & Anderson, G. A. (2013). Prevalence of *Escherichia coli* O-types and shiga toxin genes in fecal samples from feedlot cattle. *Foodborne Pathog Dis*, 10(4), 392-396. doi: 10.1089/fpd.2012.1289
- de Oliveira, M. N., Jewell, K. A., Freitas, F. S., Benjamin, L. A., Totola, M. R., Borges, A. C., . . . Suen, G. (2013). Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet Microbiol*, 164(3-4), 307-314. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.013
- de Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A. P., & Martin, C. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 77(2), 783-790. doi: 10.1128/IAI.01048-08
- de Vaux, A., Morrison, M., & Hutkins, R. W. (2002). Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from rumen medium containing prebiotic sugars. *Appl Environ Microbiol*, 68(2), 519-524.
- Dean-Nystrom, E. A., Bosworth, B. T., Moon, H. W., & O'Brien, A. D. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect Immun*, 66(9), 4560-4563.



- Dean-Nystrom, E. A., Stoffregen, W. C., Bosworth, B. T., Moon, H. W., & Pohlenz, J. F. (2008). Early attachment sites for Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated weaned calves. *Appl Environ Microbiol*, *74*(20), 6378-6384. doi: 10.1128/AEM.00636-08
- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., . . . Finlay, B. B. (2005). Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun*, *73*(4), 2135-2146. doi: 10.1128/IAI.73.4.2135-2146.2005
- Deplancke, B., & Gaskins, H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, *73*(6), 1131S-1141S.
- Diez-Gonzalez, F., Callaway, T. R., Kizoulis, M. G., & Russell, J. B. (1998). Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*, *281*(5383), 1666-1668.
- Doane, C. A., Pangloli, P., Richards, H. A., Mount, J. R., Golden, D. A., & Draughon, F. A. (2007). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *J Food Prot*, *70*(1), 6-10.
- Dobbin, H. S., Hovde, C. J., Williams, C. J., & Minnich, S. A. (2006). The *Escherichia coli* O157 flagellar regulatory gene *flhC* and not the flagellin gene *fliC* impacts colonization of cattle. *Infect Immun*, *74*(5), 2894-2905. doi: 10.1128/IAI.74.5.2894-2905.2006
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., & Wood, T. K. (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol*, *9*(2), 332-346. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01143.x
- Domka, J., Lee, J., & Wood, T. K. (2006). YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Appl Environ Microbiol*, *72*(4), 2449-2459. doi: 10.1128/AEM.72.4.2449-2459.2006
- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeenan, T., Hagevoort, R. G., & Edrington, T. S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol*, *8*, 125. doi: 10.1186/1471-2180-8-125
- Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol*, *94 Suppl*, 94S-103S.
- Duffy, G., & McCabe, E. (2014). Veterinary public health approach to managing pathogenic verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the agri-food chain. *Microbiol Spectr*, *2*(5). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0023-2013
- Duffy, L. L., Small, A., & Fegan, N. (2010). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* serotypes in sheep during slaughter at two Australian abattoirs. *Aust Vet J*, *88*(10), 399-404. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00623.x
- Dunière, L., Gleizal, A., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., & Thevenot-Sergentet, D. (2011). Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally contaminated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants. *Appl Environ Microbiol*, *77*(24), 8696-8704. doi: 10.1128/AEM.06320-11
- Dunière, L., Thevenot-Sergentet, D., & Loukiadis, E. (2012). Les *Escherichia coli* zoonotiques pathogènes. *Bulletin des GVT-Hors-Série*.
- Durso, L. M., Harhay, G. P., Smith, T. P., Bono, J. L., Desantis, T. Z., Harhay, D. M., . . . Clawson, M. L. (2010). Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Appl Environ Microbiol*, *76*(14), 4858-4862. doi: 10.1128/AEM.00207-10
- Dziva, F., Mahajan, A., Cameron, P., Currie, C., McKendrick, I. J., Wallis, T. S., . . . Stevens, M. P. (2007). EspP, a type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett*, *271*(2), 258-264. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00724.x
- Dziva, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Smith, A. J., & Wallis, T. S. (2004). Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, *150*(Pt 11), 3631-3645. doi: 10.1099/mic.0.27448-0

- Eaton, K. A., Honkala, A., Auchtung, T. A., & Britton, R. A. (2011). Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. *Infect Immun*, 79(1), 185-191. doi: 10.1128/IAI.00880-10
- Edrington, T. S., Callaway, T. R., Hallford, D. M., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2007). Influence of exogenous triiodothyronine (T3) on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Microb Ecol*, 53(4), 664-669. doi: 10.1007/s00248-006-9159-0
- Edrington, T. S., Callaway, T. R., Hallford, D. M., Chen, L., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2008). Effects of exogenous melatonin and tryptophan on fecal shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle. *Microb Ecol*, 55(3), 553-560. doi: 10.1007/s00248-007-9300-8
- Edrington, T. S., Callaway, T. R., Ives, S. E., Engler, M. J., Looper, M. L., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2006). Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathog Dis*, 3(4), 413-421. doi: 10.1089/fpd.2006.3.413
- EFSA, & ECDC. (2016). (European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 *EFSA Journal* 2016, 14(12), 4634,4231. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
- Ejidokun, O. O., Walsh, A., Barnett, J., Hope, Y., Ellis, S., Sharp, M. W., . . . Cheasty, T. (2006). Human vero cytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 infection linked to birds. *Epidemiol Infect*, 134(2), 421-423. doi: 10.1017/S0950268805004917
- Ekong, P. S., Sanderson, M. W., & Cernicchiaro, N. (2015). Prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in different seasons and cattle types processed in North America: A systematic review and meta-analysis of published research. *Prev Vet Med*, 121(1-2), 74-85. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.06.019
- Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koohmaraie, M., & Laegreid, W. W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 2999-3003. doi: 10.1073/pnas.060024897
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Giron, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., . . . 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(11), 6115-6126.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., & Hazan, R. (2006). Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet*, 2(10), e135. doi: 10.1371/journal.pgen.0020135
- Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S., & Hazan, R. (2004). Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol*, 12(2), 66-71. doi: 10.1016/j.tim.2003.12.008
- Ennis, C., McDowell, D., & Bolton, D. J. (2012). The prevalence, distribution and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. *J Appl Microbiol*, 113(5), 1238-1248. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05421.x
- Eppinger, M., Mammel, M. K., Leclerc, J. E., Ravel, J., & Cebula, T. A. (2011). Genome signatures of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from the bovine host reservoir. *Appl Environ Microbiol*, 77(9), 2916-2925. doi: 10.1128/AEM.02554-10
- Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., & Giron, J. A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189(20), 7426-7435. doi: 10.1128/JB.00464-07
- Espey, M. G. (2013). Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic Biol Med*, 55, 130-140. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.554
- Espié, E., Grimont, F., Mariani-Kurkdjian, P., Vaillant, V., & le réseau des néphrologues pédiatres. (2005). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005. Institut de veille sanitaire.

- Etcheverria, A. I., & Padola, N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*, 4(5), 366-372. doi: 10.4161/viru.24642
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., . . . Livrelli, V. (2011). Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One*, 6(8), e23594. doi: 10.1371/journal.pone.0023594
- Ewing, W. H. (1986). *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th edition*. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc.
- Fabich, A. J., Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., . . . Conway, T. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun*, 76(3), 1143-1152. doi: 10.1128/IAI.01386-07
- Fairbrother, J. M., & Nadeau, E. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech*, 25(2), 555-569.
- Faith, N. G., Shere, J. A., Brosch, R., Arnold, K. W., Ansay, S. E., Lee, M. S., . . . Kaspar, C. W. (1996). Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, 62(5), 1519-1525.
- Farfan, M. J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D. J., & Torres, A. G. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 79(9), 3744-3750. doi: 10.1128/IAI.05317-11
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., . . . Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol*, 162(2), 190-212. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
- Ferens, W. A., & Hovde, C. J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*, 8(4), 465-487. doi: 10.1089/fpd.2010.0673
- Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A. G., Chong, Y., Heuschkel, R., Murch, S. H., . . . Phillips, A. D. (2006). Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect*, 8(7), 1741-1749. doi: 10.1016/j.micinf.2006.02.012
- Fitzhenry, R. J., Pickard, D. J., Hartland, E. L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A. D., & Frankel, G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut*, 50(2), 180-185.
- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. P., & Senaud, J. (1987). Establishment of the microflora and anaerobic Fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology*, 133, 1835-1843.
- Fonty, G., Gouet, P., & Nebout, J. M. (1989). Development of the cellulolytic microflora in the rumen of lambs transferred into sterile isolators a few days after birth. *Can J Microbiol*, 35(3), 416-422.
- Fonty, G., Senaud, J., Jouany, J. P., & Gouet, P. (1988). Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Can J Microbiol*, 34(3), 235-241.
- Forano, E., Chaucheyras-Durand, F., Bertin, Y., & Martin, C. (2013). [EHEC carriage in ruminants and probiotic effects]. *Biol Aujourd'hui*, 207(4), 261-267. doi: 10.1051/jbio/2013023
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., . . . Team, H. U. S. I. (2011). Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*, 365(19), 1771-1780. doi: 10.1056/NEJMoa1106483
- Franz, E., van Hoek, A. H., Bouw, E., & Aarts, H. J. (2011). Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Appl Environ Microbiol*, 77(22), 8088-8096. doi: 10.1128/AEM.00745-11
- Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Bush, E. J., & 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(12), 7173-7178. doi: 10.1128/AEM.70.12.7173-7178.2004
- Free, A. L., Duoss, H. A., Bergeron, L. V., Shields-Menard, S. A., Ward, E., Callaway, T. R., . . . Donaldson, J. R. (2012). Survival of O157:H7 and non-O157 serogroups of *Escherichia coli* in

- bovine rumen fluid and bile salts. *Foodborne Pathog Dis*, 9(11), 1010-1014. doi: 10.1089/fpd.2012.1208
- Freestone, P. P., Haigh, R. D., & Lyte, M. (2007). Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*, 269(2), 221-228. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00619.x
- Fremaux, B., Delignette-Muller, M. L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A., & Vernozy-Rozand, C. (2007a). Growth and survival of non-O157:H7 shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol*, 102(1), 89-99. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03059.x
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M. L., Dothal, M., & Vernozy-Rozand, C. (2007b). Persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Lett Appl Microbiol*, 45(1), 55-61. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02146.x
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., & Vernozy-Rozand, C. (2008). Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet Microbiol*, 132(1-2), 1-18. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.015
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., & Rozand, C. V. (2006). Dissemination and persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet Microbiol*, 117(2-4), 180-191. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.030
- Freter, R., Brickner, H., Botney, M., Cleven, D., & Aranki, A. (1983). Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun*, 39(2), 676-685.
- 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(1), 74-84. doi: 10.1086/338115
- Frohlich, J., Baljer, G., & Menge, C. (2009). Maternally and naturally acquired antibodies to shiga toxins in a cohort of calves shedding shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 75(11), 3695-3704. doi: 10.1128/AEM.02869-08
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., . . . Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547. doi: 10.1038/nature09646
- Fukuoka, H., Inoue, Y., & Ishijima, A. (2012). Coordinated regulation of multiple flagellar motors by the *Escherichia coli* chemotaxis system. *Biophysics (Nagoya-shi)*, 8, 59-66. doi: 10.2142/biophysics.8.59
- Fukushima, H., Hoshina, K., & Gomyoda, M. (1999). Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, 65(11), 5177-5181.
- Galiero, G., Conedera, G., Alfano, D., & Caprioli, A. (2005). Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet Rec*, 156(12), 382-383.
- Gautam, R., Kulow, M., Dopfer, D., Kaspar, C., Gonzales, T., Pertzborn, K. M., . . . Ivanek, R. (2012). The strain-specific dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 faecal shedding in cattle post inoculation. *J Biol Dyn*, 6, 1052-1066. doi: 10.1080/17513758.2012.722232
- Gautam, R., Kulow, M., Park, D., Gonzales, T. K., Dahm, J., Shiroda, M., . . . Ivanek, R. (2015). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle is influenced by the level of environmental contamination. *Epidemiol Infect*, 143(2), 274-287. doi: 10.1017/S0950268814000867
- Gaytan, M. O., Martinez-Santos, V. I., Soto, E., & Gonzalez-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 129. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129
- Gedek, B. R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42(4), 261-264.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., . . . Bryant, S. H. (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), D492-496. doi: 10.1093/nar/gkp858

- Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Moretro, T., . . . Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci*, *97*(3), 298-309. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.05.023
- Goldwater, P. N., & Bettelheim, K. A. (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med*, *10*, 12. doi: 10.1186/1741-7015-10-12
- Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., . . . Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*, *47 Suppl 1*, 3-30. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015
- Gourmelon, M., Montet, M. P., Lozach, S., Le Mennec, C., Pommepuy, M., Beutin, L., & Vernozy-Rozand, C. (2006). First isolation of shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol*, *100*(1), 85-97. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02753.x
- Grauke, L. J., Kudva, I. T., Yoon, J. W., Hunt, C. W., Williams, C. J., & Hovde, C. J. (2002). Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol*, *68*(5), 2269-2277.
- Gregory, N. G., Jacobsen, L. H., Nagle, T. A., Muirhead, R. W., & Leroux, G. J. (2000). Effect of preslaughter feeding system on weight loss, gut bacteria, and the physico-chemical properties of digesta in cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *43*, 351-361. doi: doi10.1080/00288233.2000.9513434
- Grys, T. E., Siegel, M. B., Lathem, W. W., & Welch, R. A. (2005). The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun*, *73*(3), 1295-1303. doi: 10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005
- Grys, T. E., Walters, L. L., & Welch, R. A. (2006). Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Bacteriology*, *188*(13), 4646-4653. doi: Doi 10.1128/Jb.01806-05
- Guyon, R., Dorey, F., Collobert, J., Foret, J., Goubert, C., Mariau, V., & Malas, J. (2000). Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sciences des Aliments*, *73*, 97-103.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., & Rice, D. (2001). The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol*, *66*(1-2), 71-78.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., . . . Shinagawa, H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res*, *8*(1), 11-22.
- Herold, S., Paton, J. C., & Paton, A. W. (2009). Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infect Immun*, *77*(8), 3234-3243. doi: 10.1128/IAI.00031-09
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A., & Sawers, G. (1998). Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol*, *27*(2), 477-492.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., . . . Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, *111*(Pt 5), 509-547. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hill, C. (2012). Virulence or niche factors: what's in a name? *J Bacteriol*, *194*(21), 5725-5727. doi: 10.1128/JB.00980-12
- Hoey, D. E., Currie, C., Else, R. W., Nutikka, A., Lingwood, C. A., Gally, D. L., & Smith, D. G. (2002). Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J Med Microbiol*, *51*(2), 143-149. doi: 10.1099/0022-1317-51-2-143
- Hogg, R. A., Holmes, J. P., Ghebrehewet, S., Elders, K., Hart, J., Whiteside, C., . . . Pritchard, G. C. (2009). Probable zoonotic transmission of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 by dogs. *Vet Rec*, *164*(10), 304-305.

- Hughes, D. T., Terekhova, D. A., Liou, L., Hovde, C. J., Sahl, J. W., Patankar, A. V., . . . Sperandio, V. (2010). Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(21), 9831-9836. doi: 10.1073/pnas.1002551107
- Ihssen, J., & Egli, T. (2005). Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing *Escherichia coli* confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization. *Environ Microbiol*, *7*(10), 1568-1581. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00846.x
- Iida, K., Mizunoe, Y., Wai, S. N., & Yoshida, S. (2001). Type 1 fimbriation and its phase switching in diarrheagenic *Escherichia coli* strains. *Clin Diagn Lab Immunol*, *8*(3), 489-495. doi: 10.1128/CDLI.8.3.489-495.2001
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., & Muniesa, M. (2009). Phage-mediated shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol*, *75*(6), 1764-1768. doi: 10.1128/AEM.02273-08
- Islam, M. A., Mondol, A. S., de Boer, E., Beumer, R. R., Zwietering, M. H., Talukder, K. A., & Heuvelink, A. E. (2008). Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*, *74*(17), 5414-5421. doi: 10.1128/AEM.00854-08
- Islam, M. Z., Musekiwa, A., Islam, K., Ahmed, S., Chowdhury, S., Ahad, A., & Biswas, P. K. (2014). Regional variation in the prevalence of *E. coli* O157 in cattle: a meta-analysis and meta-regression. *PLoS One*, *9*(4), e93299. doi: 10.1371/journal.pone.0093299
- Iyer, R., Williams, C., & Miller, C. (2003). Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *185*(22), 6556-6561.
- Jacob, M. E., Callaway, T. R., & Nagaraja, T. G. (2009). Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathog Dis*, *6*(7), 785-792. doi: 10.1089/fpd.2009.0306
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J*, *7*(6), 1069-1079. doi: 10.1038/ismej.2013.2
- Jami, E., & Mizrahi, I. (2012). Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One*, *7*(3), e33306. doi: 10.1371/journal.pone.0033306
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A., & Unden, G. (2002). C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, *1553*(1-2), 39-56.
- Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol*, *74*(12), 3619-3625. doi: 10.1128/AEM.02812-07
- Jelcic, I., Hufner, E., Schmidt, H., & Hertel, C. (2008). Repression of the locus of the enterocyte effacement-encoded regulator of gene transcription of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus reuteri* culture supernatants is LuxS and strain dependent. *Appl Environ Microbiol*, *74*(10), 3310-3314. doi: 10.1128/AEM.00072-08
- Jeon, S. J., Elzo, M., DiLorenzo, N., Lamb, G. C., & Jeong, K. C. (2013). Evaluation of animal genetic and physiological factors that affect the prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle. *PLoS One*, *8*(2), e55728. doi: 10.1371/journal.pone.0055728
- Johansson, M. E., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schutte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., . . . Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*, *68*(22), 3635-3641. doi: 10.1007/s00018-011-0822-3
- Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Fabich, A. J., Anderson, A., Schreiner, D. M., House, A. L., . . . Conway, T. (2007). Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun*, *75*(10), 4891-4899. doi: 10.1128/IAI.00484-07
- Jones, S. A., Gibson, T., Maltby, R. C., Chowdhury, F. Z., Stewart, V., Cohen, P. S., & Conway, T. (2011). Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun*, *79*(10), 4218-4226. doi: 10.1128/IAI.05395-11
- Jones, S. A., Jorgensen, M., Chowdhury, F. Z., Rodgers, R., Hartline, J., Leatham, M. P., . . . Conway, T. (2008). Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157:H7 in the mouse intestine. *Infect Immun*, *76*(6), 2531-2540. doi: 10.1128/IAI.00096-08

- Jonsson, M. E., Eriksson, E., Boqvist, S., Urdahl, A. M., & Aspan, A. (2009). Experimental infection in calves with a specific subtype of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *Acta Vet Scand*, *51*, 43. doi: 10.1186/1751-0147-51-43
- Joris, M. A., Pierard, D., & De Zutter, L. (2011). Occurrence and virulence patterns of *E. coli* O26, O103, O111 and O145 in slaughter cattle. *Vet Microbiol*, *151*(3-4), 418-421. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.003
- Kanamaru, K., Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T., & Sasakawa, C. (2000). SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*, *38*(4), 805-816.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, *2*(2), 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818
- Kaper, J. B., & O'Brien, A. D. (2014). Overview and historical perspectives. *Microbiol Spectr*, *2*(6). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0028-2014
- Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*, *140*(3-4), 360-370. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.011
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., . . . 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*(11), 4930-4940.
- Karpman, D., Loos, S., Tati, R., & Arvidsson, I. (2017). Haemolytic uraemic syndrome. *J Intern Med*, *281*(2), 123-148. doi: 10.1111/joim.12546
- Kauffman, M. D., & LeJeune, J. (2011). European starlings (*Sturnus vulgaris*) challenged with *Escherichia coli* O157 can carry and transmit the human pathogen to cattle. *Lett Appl Microbiol*, *53*(6), 596-601. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03163.x
- Kawano, K., Okada, M., Haga, T., Maeda, K., & Goto, Y. (2008). Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *27*(3), 227-232. doi: 10.1007/s10096-007-0420-3
- Keen, J. E., Laegreid, W. W., Chitko-McKown, C. G., Durso, L. M., & Bono, J. L. (2010). Distribution of shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. *Appl Environ Microbiol*, *76*(15), 5278-5281. doi: 10.1128/AEM.00400-10
- Keeney, K. M., & Finlay, B. B. (2013). Microbiology: EHEC downregulates virulence in response to intestinal fucose. *Curr Biol*, *23*(3), R108-110. doi: 10.1016/j.cub.2012.12.027
- Kendall, M. M., Gruber, C. C., Parker, C. T., & Sperandio, V. (2012). Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio*, *3*(3). doi: 10.1128/mBio.00050-12
- Kendall, M. M., & Sperandio, V. (2016). What a dinner party! Mechanisms and functions of interkingdom signaling in host-pathogen associations. *MBio*, *7*(2), e01748. doi: 10.1128/mBio.01748-15
- Kieckens, E., Rybarczyk, J., De Zutter, L., Duchateau, L., Vanrompay, D., & Cox, E. (2015). Clearance of *Escherichia coli* O157:H7 infection in calves by rectal administration of bovine lactoferrin. *Appl Environ Microbiol*, *81*(5), 1644-1651. doi: 10.1128/AEM.03724-14
- Kieckens, E., Rybarczyk, J., Li, R. W., Vanrompay, D., & Cox, E. (2016). Potential immunosuppressive effects of *Escherichia coli* O157:H7 experimental infection on the bovine host. *BMC Genomics*, *17*(1), 1049. doi: 10.1186/s12864-016-3374-y
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol*, *76*(1), 49-63. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x
- King, L. A., Gouali, M., Mariani-Kurkdjian, P., Vaillant, V., & le réseau des néphrologues pédiatres. (2012). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2012. *Santé publique France*.
- King, L. A., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Haeghebaert, S., Weill, F. X., Baliere, C., . . . de Valk, H. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground

- beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clin Microbiol Infect*, 20(12), O1136-1144. doi: 10.1111/1469-0691.12736
- King, L. A., Macé, M., Mariani-Kurkdjian, P., Gouali, M., Vaillant, V., & le réseau des néphrologues pédiatres. (2011). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2011. *Santé publique France*.
- King, L. A., Mariani-Kurkdjian, P., Gouali, M., Vaillant, V., & le réseau des néphrologues pédiatres. (2013). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013. *Santé publique France*.
- King, T., Lucchini, S., Hinton, J. C., & Gobius, K. (2010). Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Appl Environ Microbiol*, 76(19), 6514-6528. doi: 10.1128/AEM.02392-09
- Kintz, E., Brainard, J., Hooper, L., & Hunter, P. (2017). Transmission pathways for sporadic shiga-toxin producing *E. coli* infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Hyg Environ Health*, 220(1), 57-67. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.10.011
- Kittelmann, S., & Janssen, P. H. (2011). Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbiol Ecol*, 75(3), 468-481. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01022.x
- Kittelmann, S., Sedorf, H., Walters, W. A., Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., & Janssen, P. H. (2013). Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One*, 8(2), e47879. doi: 10.1371/journal.pone.0047879
- Kolde, R. pheatmap: pretty heatmaps. from <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap> (2015). Assessed 10 Jan 2017.
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., & Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 23. doi: 10.3389/fcimb.2015.00023
- Kresse, A. U., Rohde, M., & Guzman, C. A. (1999). The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect Immun*, 67(9), 4834-4842.
- Kruger, A., & Lucchesi, P. M. (2015). Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology*, 161(Pt 3), 451-462. doi: 10.1099/mic.0.000003
- Kudva, I. T., Blanch, K., & Hovde, C. J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol*, 64(9), 3166-3174.
- Kudva, I. T., & Dean-Nystrom, E. A. (2011). Bovine recto-anal junction squamous epithelial (RSE) cell adhesion assay for studying *Escherichia coli* O157 adherence. *J Appl Microbiol*, 111(5), 1283-1294. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05139.x
- Kudva, I. T., Griffin, R. W., Krastins, B., Sarracino, D. A., Calderwood, S. B., & John, M. (2012). Proteins other than the locus of enterocyte effacement-encoded proteins contribute to *Escherichia coli* O157:H7 adherence to bovine rectoanal junction stratified squamous epithelial cells. *BMC Microbiol*, 12, 103. doi: 10.1186/1471-2180-12-103
- Kudva, I. T., Hovde, C. J., & John, M. (2013). Adherence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine recto-anal junction squamous epithelial cells appears to be mediated by mechanisms distinct from those used by O157. *Foodborne Pathog Dis*, 10(4), 375-381. doi: 10.1089/fpd.2012.1382
- Kudva, I. T., Stanton, T. B., & Lippolis, J. D. (2014). The *Escherichia coli* O157:H7 bovine rumen fluid proteome reflects adaptive bacterial responses. *BMC Microbiol*, 14, 48. doi: 10.1186/1471-2180-14-48
- Kulow, M. J., Gonzales, T. K., Pertzborn, K. M., Dahm, J., Miller, B. A., Park, D., . . . Dopfer, D. (2012). Differences in colonization and shedding patterns after oral challenge of cattle with three *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Appl Environ Microbiol*, 78(22), 8045-8055. doi: 10.1128/AEM.02363-12



- Kyle, J. L., Parker, C. T., Goudeau, D., & Brandl, M. T. (2010). Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. *Appl Environ Microbiol*, 76(5), 1375-1387. doi: 10.1128/AEM.02461-09
- La Ragione, R. M., Best, A., Woodward, M. J., & Wales, A. D. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol Rev*, 33(2), 394-410. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00138.x
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M., & Frankel, G. (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 15(11), 1796-1808. doi: 10.1111/cmi.12179
- Lal, A., Hales, S., French, N., & Baker, M. G. (2012). Seasonality in human zoonotic enteric diseases: a systematic review. *PLoS One*, 7(4), e31883. doi: 10.1371/journal.pone.0031883
- Lapeyraque, A. L., Malina, M., Fremeaux-Bacchi, V., Boppel, T., Kirschfink, M., Oualha, M., . . . Schaefer, F. (2011). Eculizumab in severe shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med*, 364(26), 2561-2563. doi: 10.1056/NEJMc1100859
- Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., & Welch, R. A. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157 : H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular Microbiology*, 45(2), 277-288.
- Latif, H., Li, H. J., Charusanti, P., Palsson, B. O., & Aziz, R. K. (2014). A gapless, unambiguous genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Genome Announc*, 2(4). doi: 10.1128/genomeA.00821-14
- Lavery, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*, 3(3), 596-632. doi: 10.3390/pathogens3030596
- Le Bihan, G., Jubelin, G., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Martin, C., Beaudry, F., & Harel, J. (2015). Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 grown *in vitro* in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes. *Microbes Infect*, 17(1), 23-33. doi: 10.1016/j.micinf.2014.09.008
- Leatham, M. P., Banerjee, S., Autieri, S. M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., & Cohen, P. S. (2009). Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun*, 77(7), 2876-2886. doi: 10.1128/IAI.00059-09
- Leatham, M. P., Stevenson, S. J., Gauger, E. J., Krogfelt, K. A., Lins, J. J., Haddock, T. L., . . . Cohen, P. S. (2005). Mouse intestine selects nonmotile *flhDC* mutants of *Escherichia coli* MG1655 with increased colonizing ability and better utilization of carbon sources. *Infect Immun*, 73(12), 8039-8049. doi: 10.1128/IAI.73.12.8039-8049.2005
- Leopold, S. R., Magrini, V., Holt, N. J., Shaikh, N., Mardis, E. R., Cagno, J., . . . Tarr, P. I. (2009). A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8713-8718. doi: 10.1073/pnas.0812949106
- Levine, M. M., Xu, J. G., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., . . . Wachsmuth, K. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*, 156(1), 175-182.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, 64, 357-372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Lewis, S. B., Cook, V., Tighe, R., & Schuller, S. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium *in vitro* and *ex vivo*. *Infect Immun*, 83(3), 942-949. doi: 10.1128/IAI.02928-14
- Li, H., & Durbin, R. (2009a). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Genome Project Data Processing, S. (2009b). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Lim, J. Y., Li, J., Sheng, H., Besser, T. E., Potter, K., & Hovde, C. J. (2007a). *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1380-1382. doi: 10.1128/AEM.02242-06
- Lim, J. Y., Sheng, H., Seo, K. S., Park, Y. H., & Hovde, C. J. (2007b). Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 plasmid O157 deletion mutant and its survival and persistence in cattle. *Appl Environ Microbiol*, 73(7), 2037-2047. doi: 10.1128/AEM.02643-06
- Lim, J. Y., Yoon, J., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, 20(1), 5-14.
- Los, J. M., Los, M., Wegrzyn, A., & Wegrzyn, G. (2010). Hydrogen peroxide-mediated induction of the shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58(3), 322-329. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00644.x
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15(12), 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Low, A. S., Dziva, F., Torres, A. G., Martinez, J. L., Rosser, T., Naylor, S., . . . Gally, D. L. (2006). Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 74(4), 2233-2244. doi: 10.1128/IAI.74.4.2233-2244.2006
- Low, J. C., McKendrick, I. J., McKechnie, C., Fenlon, D., Naylor, S. W., Currie, C., . . . Gally, D. L. (2005). Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 93-97. doi: 10.1128/AEM.71.1.93-97.2005
- Macfarlane, S., Bahrami, B., & Macfarlane, G. T. (2011). Mucosal biofilm communities in the human intestinal tract. *Adv Appl Microbiol*, 75, 111-143. doi: 10.1016/B978-0-12-387046-9.00005-0
- Magnuson, R. D. (2007). Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. *J Bacteriol*, 189(17), 6089-6092. doi: 10.1128/JB.00958-07
- Mahajan, A., Currie, C. G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., . . . Smith, D. G. (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol*, 11(1), 121-137. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01244.x
- Mainil, J. G., & Daube, G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol*, 98(6), 1332-1344. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C. H., . . . Shinagawa, H. (1998). Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res*, 5(1), 1-9.
- Malmuthuge, N., Griebel, P. J., & Guan le, L. (2014). Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Appl Environ Microbiol*, 80(6), 2021-2028. doi: 10.1128/AEM.03864-13
- Malmuthuge, N., Li, M., Chen, Y., Fries, P., Griebel, P. J., Baurhoo, B., . . . Guan, L. L. (2012). Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol Ecol*, 79(2), 337-347. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01220.x
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M. P., Gibson, T., Cohen, P. S., & Conway, T. (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One*, 8(1), e53957. doi: 10.1371/journal.pone.0053957
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W. (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci Rep*, 5, 16116. doi: 10.1038/srep16116

- Mariette, J., Escudie, F., Allias, N., Salin, G., Noirot, C., Thomas, S., & Klopp, C. (2012). NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics*, *13*, 462. doi: 10.1186/1471-2164-13-462
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, *17*(1), 10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- Martinez-Vaz, B. M., Fink, R. C., Diez-Gonzalez, F., & Sadowsky, M. J. (2014). Enteric pathogen-plant interactions: molecular connections leading to colonization and growth and implications for food safety. *Microbes Environ*, *29*(2), 123-135.
- Martino, P. D., Fursy, R., Bret, L., Sundararaju, B., & Phillips, R. S. (2003). Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol*, *49*(7), 443-449. doi: 10.1139/w03-056
- Martorelli, L., Hovde, C. J., Vilte, D. A., Albanese, A., Zotta, E., Ibarra, C., . . . Cataldi, A. (2015). Impact of infection dose and previous serum antibodies against the locus of enterocyte effacement proteins on *Escherichia coli* O157:H7 shedding in calves following experimental infection. *Biomed Res Int*, *2015*, 290679. doi: 10.1155/2015/290679
- Matheron, C., Delort, A. M., Gaudet, G., Forano, E., & Liptaj, T. (1998). 13C and 1H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl Environ Microbiol*, *64*(1), 74-81.
- Matthews, L., McKendrick, I. J., Ternent, H., Gunn, G. J., Synge, B., & Woolhouse, M. E. (2006). Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol Infect*, *134*(1), 131-142. doi: 10.1017/S0950268805004590
- Matthews, L., Reeve, R., Gally, D. L., Low, J. C., Woolhouse, M. E., McAteer, S. P., . . . Reid, S. W. (2013). Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(40), 16265-16270. doi: 10.1073/pnas.1304978110
- Maule, A. (2000). Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*(29), 71S-78S.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., & Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci*, *72*(11), 3004-3018.
- McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Alazeh, A. Y., Baah, J., Teather, R. M., & Stanford, K. (2011). The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can J Anim Sci*, *91*, 193-211.
- McGee, P., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., Earley, B., & Leonard, N. (2001). The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Lett Appl Microbiol*, *32*(3), 152-155.
- McSweeney, C. S., & Mackie, R. (2012). Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. *Food and Agriculture Organization of the United Nation. Background study paper N°61*.
- McWilliams, B. D., & Torres, A. G. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectr*, *2*(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013
- Medellin-Pena, M. J., & Griffiths, M. W. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol*, *75*(4), 1165-1172. doi: 10.1128/AEM.01651-08
- Medellin-Pena, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., & Griffiths, M. W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, *73*(13), 4259-4267. doi: 10.1128/AEM.00159-07
- Medhanie, G. A., Pearl, D. L., McEwen, S. A., Guerin, M. T., Jardine, C. M., Schrock, J., & LeJeune, J. T. (2014). A longitudinal study of feed contamination by European starling excreta in Ohio dairy farms (2007-2008). *J Dairy Sci*, *97*(8), 5230-5238. doi: 10.3168/jds.2014-8045
- Mellies, J. L., & Lorenzen, E. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Microbiol Spectr*, *2*(4), EHEC-0004-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0004-2013
- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga ooxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr*, *2*(4), EHEC-0024-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013

- Mermin, J. H., & Griffin, P. M. (1999). Public health in crisis: outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Japan. *Am J Epidemiol*, *150*(8), 797-803; discussion 804-795.
- Mir, R. A., Weppelmann, T. A., Elzo, M., Ahn, S., Driver, J. D., & Jeong, K. C. (2016). Colonization of beef cattle by shiga toxin-producing *Escherichia coli* during the first year of life: a cohort study. *PLoS One*, *11*(2), e0148518. doi: 10.1371/journal.pone.0148518
- Mir, R. A., Weppelmann, T. A., Kang, M., Bliss, T. M., DiLorenzo, N., Lamb, G. C., . . . Jeong, K. C. (2015). Association between animal age and the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle. *Vet Microbiol*, *175*(2-4), 325-331. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.12.016
- Miranda, R. L., Conway, T., Leatham, M. P., Chang, D. E., Norris, W. E., Allen, J. H., . . . Cohen, P. S. (2004). Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun*, *72*(3), 1666-1676.
- Montagne, L., Toullec, R., & Lalles, J. P. (2000). Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Dairy Sci*, *83*(3), 507-517. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74910-1
- Moran, A. P., Gupta, A., & Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut*, *60*(10), 1412-1425. doi: 10.1136/gut.2010.212704
- Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2016). The epinephrine/norepinephrine/autoinducer-3 interkingdom signaling system in *Escherichia coli* O157:H7. *Adv Exp Med Biol*, *874*, 247-261. doi: 10.1007/978-3-319-20215-0\_12
- Moxley, R. A., & Acuff, G. R. (2014). Peri- and postharvest factors in the control of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Microbiol Spectr*, *2*(6). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0017-2013
- Moxley, R. A., & Smith, D. R. (2010). Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, *26*(1), 29-56, table of contents. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.011
- Mukhopadhyay, S., & Linstedt, A. D. (2012). Manganese blocks intracellular trafficking of shiga toxin and protects against shiga toxicosis. *Science*, *335*(6066), 332-335. doi: 10.1126/science.1215930
- Munns, K. D., Selinger, L. B., Stanford, K., Guan, L., Callaway, T. R., & McAllister, T. A. (2015). Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle. *Foodborne Pathog Dis*, *12*(2), 89-103. doi: 10.1089/fpd.2014.1829
- Munns, K. D., Zaheer, R., Xu, Y., Stanford, K., Laing, C. R., Gannon, V. P., . . . McAllister, T. A. (2016). Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle. *PLoS One*, *11*(3), e0151673. doi: 10.1371/journal.pone.0151673
- Nakanishi, N., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, *155*(Pt 2), 521-530. doi: 10.1099/mic.0.023499-0
- Nart, P., Naylor, S. W., Huntley, J. F., McKendrick, I. J., Gally, D. L., & Low, J. C. (2008). Responses of cattle to gastrointestinal colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, *76*(11), 5366-5372. doi: 10.1128/IAI.01223-07
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, *11*(1), 142-201.
- Naylor, S. W., Flockhart, A., Nart, P., Smith, D. G., Huntley, J., Gally, D. L., & Low, J. C. (2007). Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Appl Environ Microbiol*, *73*(11), 3765-3767. doi: 10.1128/AEM.02670-06
- Naylor, S. W., Gally, D. L., & Low, J. C. (2005a). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, *295*(6-7), 419-441.
- Naylor, S. W., Low, J. C., Besser, T. E., Mahajan, A., Gunn, G. J., Pearce, M. C., . . . Gally, D. L. (2003). Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun*, *71*(3), 1505-1512.

- Naylor, S. W., Roe, A. J., Nart, P., Spears, K., Smith, D. G., Low, J. C., & Gally, D. L. (2005b). *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the *LEE4* operon. *Microbiology*, *151*(Pt 8), 2773-2781. doi: 10.1099/mic.0.28060-0
- Neves, B. C., Shaw, R. K., Frankel, G., & Knutton, S. (2003). Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, *71*(4), 2262-2265.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J., & Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour Technol*, *96*(2), 135-143. doi: 10.1016/j.biortech.2004.02.030
- Niu, Y. D., Xu, Y., McAllister, T. A., Rozema, E. A., Stephens, T. P., Bach, S. J., . . . Stanford, K. (2008). Comparison of fecal versus rectoanal mucosal swab sampling for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle used in assessing bacteriophage as a mitigation strategy. *J Food Prot*, *71*(4), 691-698.
- Njoroge, J. W., Nguyen, Y., Curtis, M. M., Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2012). Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio*, *3*(5), e00280-00212. doi: 10.1128/mBio.00280-12
- O'Brien, S. B., Duffy, G., Carney, E., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., & Blair, I. S. (2005). Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157 on bovine hides at a beef slaughter plant. *J Food Prot*, *68*(4), 660-665.
- O'Loughlin, E. V., & Robins-Browne, R. M. (2001). Effect of shiga toxin and shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect*, *3*(6), 493-507.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., . . . Takeda, Y. (2001). Inhibition of in vitro growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int J Food Microbiol*, *68*(1-2), 135-140.
- Ogden, I. D., MacRae, M., & Strachan, N. J. (2004). Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol Lett*, *233*(2), 297-300. doi: 10.1016/j.femsle.2004.02.021
- Ohya, T., & Ito, H. (1999). Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7. *J Vet Med Sci*, *61*(10), 1187-1189.
- Ohya, T., Marubashi, T., & Ito, H. (2000). Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157 from calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. *J Vet Med Sci*, *62*(11), 1151-1155.
- Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I. D., & Strachan, N. J. (2003). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol*, *69*(5), 2444-2447.
- Orth, D., Ehrlenbach, S., Brockmeyer, J., Khan, A. B., Huber, G., Karch, H., . . . Wurzner, R. (2010). EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect Immun*, *78*(10), 4294-4301. doi: 10.1128/IAI.00488-10
- Ottman, N., Davids, M., Suarez-Diez, M., Boeren, S., Schaap, P. J., Martins Dos Santos, V. A. P., . . . de Vos, W. M. (2017). Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of *Akkermansia muciniphila* reveal a preferential mucin-degrading lifestyle. *Appl Environ Microbiol*, *83*(18). doi: 10.1128/AEM.01014-17
- Ozutsumi, Y., Hayashi, H., Sakamoto, M., Itabashi, H., & Benno, Y. (2005). Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. *Biosci Biotechnol Biochem*, *69*(9), 1793-1797. doi: 10.1271/bbb.69.1793
- Pacheco, A. R., Curtis, M. M., Ritchie, J. M., Munera, D., Waldor, M. K., Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature*, *492*(7427), 113-117. doi: 10.1038/nature11623
- Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*, *12*(4), 208-214. doi: 10.1038/nchembio.2044
- Parker, C. T., Kyle, J. L., Huynh, S., Carter, M. Q., Brandl, M. T., & Mandrell, R. E. (2012). Distinct transcriptional profiles and phenotypes exhibited by *Escherichia coli* O157:H7 isolates related

- to the 2006 spinach-associated outbreak. *Appl Environ Microbiol*, 78(2), 455-463. doi: 10.1128/AEM.06251-11
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., & 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(11), 6999-7009. doi: 10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001
- Paton, A. W., Voss, E., Manning, P. A., & Paton, J. C. (1998). Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Microb Pathog*, 24(1), 57-63. doi: 10.1006/mpat.1997.0172
- Pedersen, K., & Clark, L. (2007). A review of shiga toxin *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in cattle and free-ranging birds: potential association and epidemiological links. *Human-Wildlife Conflicts*, 1(1), 68-77.
- Penrod, J. T., Mace, C. C., & Roth, J. R. (2004). A pH-sensitive function and phenotype: evidence that EutH facilitates diffusion of uncharged ethanolamine in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 186(20), 6885-6890. doi: 10.1128/JB.186.20.6885-6890.2004
- Perna, N. T., Mayhew, G. F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., & Blattner, F. R. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 66(8), 3810-3817.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., . . . Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 409(6819), 529-533. doi: 10.1038/35054089
- Persad, A. K., & LeJeune, J. T. (2014). Animal reservoirs of shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 2(4), EHEC-0027-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
- Peterson, R. E., Klopfenstein, T. J., Moxley, R. A., Erickson, G. E., Hinkley, S., Bretschneider, G., . . . Smith, D. R. (2007). Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. *J Food Prot*, 70(11), 2568-2577.
- Phillips, A. D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., & Frankel, G. (2000). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut*, 47(3), 377-381.
- Picozzi, C., Antoniani, D., Vigentini, I., & Foschino, R. (2016). Genotypic characterization and biofilm formation of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 364(2). doi: doi.org/10.1093/femsle/fnw291
- Pifer, R., & Sperandio, V. (2014). The interplay between the microbiota and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 2(5). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0015-2013
- Pohlenz, J. F., & Dean-Nystrom, E. A. (2004). Colonisation of *Escherichia coli* O157:H7 on squamous epithelial cells at the rectal-anal junction. *Vet Rec*, 155(8), 248.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., . . . 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(3), 1023-1031.
- Preidis, G. A., Hill, C., Guerrant, R. L., Ramakrishna, B. S., Tannock, G. W., & Versalovic, J. (2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*, 140(1), 8-14. doi: 10.1053/j.gastro.2010.11.010
- Price, C. E., & Driessen, A. J. (2010). Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1803(6), 748-766. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.019
- Price, S. B., Wright, J. C., DeGraves, F. J., Castanie-Cornet, M. P., & Foster, J. W. (2004). Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Appl Environ Microbiol*, 70(8), 4792-4799. doi: 10.1128/AEM.70.8.4792-4799.2004

- Pruimboom-Brees, I. M., Morgan, T. W., Ackermann, M. R., Nystrom, E. D., Samuel, J. E., Cornick, N. A., & Moon, H. W. (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(19), 10325-10329. doi: 10.1073/pnas.190329997
- Puttamreddy, S., Cornick, N. A., & Minion, F. C. (2010). Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect Immun*, *78*(6), 2377-2384. doi: 10.1128/IAI.00156-10
- R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. (2016). from <https://www.r-project.org>. Accessed 20 Dec 2016
- Rasmussen, M. A., & Casey, T. A. (2001). Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Crit Rev Microbiol*, *27*(2), 57-73. doi: 10.1080/20014091096701
- Rasmussen, M. A., Cray, W. C., Jr., Casey, T. A., & Whipp, S. C. (1993). Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, *114*(1), 79-84.
- Raynaud, S., Boscher, P., Picant, P., Mathieu, B., Degand, C., pPoutreil, B., . . . Vernozy-Rozand, C. (2005). Prévalence, origine, circulation et persistance des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins français. *Renc Rech Ruminants*, *12*, 379-392.
- Reading, N. C., Rasko, D. A., Torres, A. G., & Sperandio, V. (2009). The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(14), 5889-5894. doi: 10.1073/pnas.0811409106
- Rendon, M. A., Saldana, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J. B., . . . Giron, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(25), 10637-10642. doi: 10.1073/pnas.0704104104
- Riff, J. D., Callahan, J. W., & Sherman, P. M. (2005). Cholesterol-enriched membrane microdomains are required for inducing host cell cytoskeleton rearrangements in response to attaching-effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, *73*(11), 7113-7125. doi: 10.1128/IAI.73.11.7113-7125.2005
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., . . . Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, *308*(12), 681-685. doi: 10.1056/NEJM198303243081203
- Rivero, M. A., Passucci, J. A., Rodriguez, E. M., & Parma, A. E. (2010). Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *J Med Microbiol*, *59*(Pt 3), 345-352. doi: 10.1099/jmm.0.015560-0
- Robinson, C. M., Sinclair, J. F., Smith, M. J., & O'Brien, A. D. (2006). Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(25), 9667-9672. doi: 10.1073/pnas.0602359103
- Roe, A. J., Currie, C., Smith, D. G., & Gally, D. L. (2001). Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiology*, *147*(Pt 1), 145-152. doi: 10.1099/00221287-147-1-145
- Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., & Lange, M. (2001). Characterization of shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int J Food Microbiol*, *63*(3), 217-223.
- Rostagno, M. H. (2009). Can stress in farm animals increase food safety risk? *Foodborne Pathog Dis*, *6*(7), 767-776. doi: 10.1089/fpd.2009.0315
- Rounds, J. M., Rigdon, C. E., Muhl, L. J., Forstner, M., Danzeisen, G. T., Koziol, B. S., . . . Smith, K. E. (2012). Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with venison. *Emerg Infect Dis*, *18*(2), 279-282. doi: 10.3201/eid1802.110855
- Rumi, M. V., Irino, K., Deza, N., Huguet, M. J., & Bentancor, A. B. (2012). First isolation in Argentina of a highly virulent shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *J Infect Dev Ctries*, *6*(4), 358-363.
- Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, *292*(5519), 1119-1122.

- Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 247-254. doi: 10.1128/AEM.71.1.247-254.2005
- Sabouri, S., Sepehrizadeh, Z., Amirpour-Rostami, S., & Skurnik, M. (2017). A minireview on the *in vitro* and *in vivo* experiments with anti-*Escherichia coli* O157:H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents. *Int J Food Microbiol*, 243, 52-57. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.004
- Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A. H., Mousavi, S. L., Nazarian, S., & Amani, J. (2017). A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. *Microb Pathog*, 103, 186-195. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.001
- Saha, M., McDaniel, J. K., & Zheng, X. L. (2017). Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis, and potential novel therapeutics. *J Thromb Haemost*. doi: 10.1111/jth.13764
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Current protocols in molecular biology. In F. M. Ausubel, M. Brent, R. E. Kingston & J. G. Moore (Eds.), *Molecular cloning: A laboratory manual* (Seconde ed., Vol. 1 and 2, pp. 1626 pp). New York: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.
- Sanderson, M. W., Besser, T. E., Gay, J. M., Gay, C. C., & Hancock, D. D. (1999). Fecal *Escherichia coli* O157:H7 shedding patterns of orally inoculated calves. *Vet Microbiol*, 69(3), 199-205.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A. B., Skotland, T., & Torgersen, M. L. (2010). Endocytosis and retrograde transport of shiga toxin. *Toxicon*, 56(7), 1181-1185. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021
- Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Le Cam, A., . . . Falentin, H. (2013). A unique *in vivo* experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. *BMC Genomics*, 14, 911. doi: 10.1186/1471-2164-14-911
- Scheutz, F. (2014). Taxonomy meets public health: the case of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 2(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., . . . O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*, 50(9), 2951-2963. doi: 10.1128/JCM.00860-12
- Schultz, C. L., Edrington, T. S., Callaway, T. R., Schroeder, S. B., Hallford, D. M., Genovese, K. J., . . . Nisbet, D. J. (2006). The influence of melatonin on growth of *E. coli* O157:H7 in pure culture and exogenous melatonin on faecal shedding of *E. coli* O157:H7 in experimentally infected wethers. *Lett Appl Microbiol*, 43(1), 105-110. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01909.x
- Schultz, C. L., Edrington, T. S., Schroeder, S. B., Hallford, D. M., Genovese, K. J., Callaway, T. R., . . . Nisbet, D. J. (2005). Effect of the thyroid on faecal shedding of *E. coli* O157:H7 and *Escherichia coli* in naturally infected yearling beef cattle. *J Appl Microbiol*, 99(5), 1176-1180. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02705.x
- Segura, A., Auffret, P., Klopp, C., Bertin, Y., & Forano, E. (2017). Draft genome sequence and characterization of commensal *Escherichia coli* strain BG1 isolated from bovine gastrointestinal tract. *Stand Genomic Sci*, 12, 61. doi: 10.1186/s40793-017-0272-0
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., & Muniesa, M. (2007). Insertion site occupancy by *stx2* bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J Bacteriol*, 189(18), 6645-6654. doi: 10.1128/JB.00466-07
- Shaikh, N., Holt, N. J., Johnson, J. R., & Tarr, P. I. (2007). Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 273(1), 58-63. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00781.x
- Sharma, V. K., & Bearson, S. M. (2013). Evaluation of the impact of quorum sensing transcriptional regulator SdiA on long-term persistence and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Microb Pathog*, 57, 21-26. doi: 10.1016/j.micpath.2013.02.002



- Sharma, V. K., Sacco, R. E., Kunkle, R. A., Bearson, S. M., & Palmquist, D. E. (2012). Correlating levels of type III secretion and secreted proteins with fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Infect Immun*, *80*(4), 1333-1342. doi: 10.1128/IAI.05869-11
- Sheng, H., Knecht, H. J., Kudva, I. T., & Hovde, C. J. (2006a). Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol*, *72*(8), 5359-5366. doi: 10.1128/AEM.00099-06
- Sheng, H., Lim, J. Y., Knecht, H. J., Li, J., & Hovde, C. J. (2006b). Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun*, *74*(8), 4685-4693. doi: 10.1128/IAI.00406-06
- Sheng, H., Nguyen, Y. N., Hovde, C. J., & Sperandio, V. (2013). SdiA aids enterohemorrhagic *Escherichia coli* carriage by cattle fed a forage or grain diet. *Infect Immun*, *81*(9), 3472-3478. doi: 10.1128/IAI.00702-13
- Sheng, H., Shringi, S., Baker, K. N., Minnich, S. A., Hovde, C. J., & Besser, T. E. (2015). Standardized *Escherichia coli* O157:H7 exposure studies in cattle provide evidence that bovine factors do not drive increased summertime colonization. *Appl Environ Microbiol*, *82*(3), 964-971. doi: 10.1128/AEM.02839-15
- Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S., Goulet, J., & Tompkins, T. A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, *73*(8), 5183-5188. doi: 10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005
- Shin, R., Suzuki, M., & Morishita, Y. (2002). Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Med Microbiol*, *51*(3), 201-206. doi: 10.1099/0022-1317-51-3-201
- Sinclair, J. F., & O'Brien, A. D. (2004). Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J Biol Chem*, *279*(32), 33751-33758. doi: 10.1074/jbc.M401616200
- Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., . . . Klopfenstein, T. (2001). Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J Food Prot*, *64*(12), 1899-1903.
- Smith, D. G., Naylor, S. W., & Gally, D. L. (2002). Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle. *Int J Med Microbiol*, *292*(3-4), 169-183. doi: 10.1078/1438-4221-00202
- Smith, K. E., Wilker, P. R., Reiter, P. L., Hedican, E. B., Bender, J. B., & Hedberg, C. W. (2012). Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr Infect Dis J*, *31*(1), 37-41. doi: 10.1097/INF.0b013e31823096a8
- Snider, T. A., Fabich, A. J., Conway, T., & Clinkenbeard, K. D. (2009). *E. coli* O157:H7 catabolism of intestinal mucin-derived carbohydrates and colonization. *Vet Microbiol*, *136*(1-2), 150-154. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.033
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., & Nesse, L. L. (2013). Biofilm as an environment for dissemination of *stx* genes by transduction. *Appl Environ Microbiol*, *79*(3), 896-900. doi: 10.1128/AEM.03512-12
- Sonnenborn, U., & Schuldes, J. (2009). The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - features of versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *21*, 122-158.
- Sperandio, V. (2010). SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7 in the bovine rumen. *Gut Microbes*, *1*(6), 432-435. doi: 10.4161/gmic.1.6.14177
- Sperandio, V., Torres, A. G., Giron, J. A., & Kaper, J. B. (2001). Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, *183*(17), 5187-5197.
- Spooner, R. A., & Lord, J. M. (2012). How ricin and shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Curr Top Microbiol Immunol*, *357*, 19-40. doi: 10.1007/82\_2011\_154

- Stanford, K., Johnson, R. P., Alexander, T. W., McAllister, T. A., & Reuter, T. (2016). Influence of season and feedlot location on prevalence and virulence factors of seven serogroups of *Escherichia coli* in feces of Western-Canadian slaughter cattle. *PLoS One*, *11*(8), e0159866. doi: 10.1371/journal.pone.0159866
- Stecher, B. (2015). The roles of inflammation, nutrient availability and the commensal microbiota in enteric pathogen infection. *Microbiol Spectr*, *3*(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0008-2014
- Stecher, B., & Hardt, W. D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*, *16*(3), 107-114. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.008
- Stevens, M. P., & Frankel, G. M. (2014). The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, *2*(4), EHEC-0007-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013
- Stevens, M. P., Roe, A. J., Vlisidou, I., van Diemen, P. M., La Ragione, R. M., Best, A., . . . Wallis, T. S. (2004). Mutation of *tox B* 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*(9), 5402-5411. doi: 10.1128/IAI.72.9.5402-5411.2004
- Stevens, M. P., van Diemen, P. M., Frankel, G., Phillips, A. D., & Wallis, T. S. (2002). Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun*, *70*(9), 5158-5166.
- Steyert, S. R., Sahl, J. W., Fraser, C. M., Teel, L. D., Scheutz, F., & Rasko, D. A. (2012). Comparative genomics and *stx* phage characterization of LEE-negative shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, *2*, 133. doi: 10.3389/fcimb.2012.00133
- Stojiljkovic, I., Cobeljic, M., & Hantke, K. (1993). *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett*, *108*(1), 111-115.
- Su, L. K., Lu, C. P., Wang, Y., Cao, D. M., Sun, J. H., & Yan, Y. X. (2010). [Lysogenic infection of a shiga toxin 2-converting bacteriophage changes host gene expression, enhances host acid resistance and motility]. *Mol Biol (Mosk)*, *44*(1), 60-73.
- Talarico, T. L., & Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*, *33*(5), 674-679.
- Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G. W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., . . . Xie, X. S. (2010). Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, *329*(5991), 533-538. doi: 10.1126/science.1188308
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., . . . 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*(3), 1400-1407.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., . . . Sasakawa, C. (2001). *tox B* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun*, *69*(11), 6660-6669. doi: 10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001
- Tesh, V. L. (2010). Induction of apoptosis by shiga toxins. *Future Microbiol*, *5*(3), 431-453. doi: 10.2217/fmb.10.4
- Thomas, D. E., & Elliott, E. J. (2013). Interventions for preventing diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: systematic review. *BMC Public Health*, *13*, 799. doi: 10.1186/1471-2458-13-799
- Thomas, K. M., McCann, M. S., Collery, M. M., Logan, A., Whyte, P., McDowell, D. A., & Duffy, G. (2012). Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *Int J Food Microbiol*, *153*(3), 288-296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.012
- Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., . . . Pallen, M. J. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of

- lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40), 14941-14946. doi: 10.1073/pnas.0604891103
- Torres, A. G., Kanack, K. J., Tutt, C. B., Popov, V., & Kaper, J. B. (2004). Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 238(2), 333-344. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.053
- Torres, A. G., & Kaper, J. B. (2003). Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun*, 71(9), 4985-4995.
- Torres, A. G., Perna, N. T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F. R., & Kaper, J. B. (2002). Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 45(4), 951-966.
- Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Fioravanti, R., Gally, D., Xu, X., . . . Morabito, S. (2014). Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. *Infect Immun*, 82(7), 3023-3032. doi: 10.1128/IAI.01836-14
- Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res*, 78(2), 110-116.
- Trotz-Williams, L. A., Mercer, N. J., Walters, J. M., Maki, A. M., & Johnson, R. P. (2012). Pork implicated in a shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Can J Public Health*, 103(5), e322-326.
- Turnbull, K. J., & Gerdes, K. (2017). HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses *hicAB* transcription to selectively produce HicB antitoxin. *Mol Microbiol*, 104(5), 781-792. doi: 10.1111/mmi.13662
- Uhlich, G. A. (2009). KatP contributes to OxyR-regulated hydrogen peroxide resistance in *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology*, 155(Pt 11), 3589-3598. doi: 10.1099/mic.0.031435-0
- Uندن, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta*, 1320(3), 217-234.
- Uندن, G., Strecker, A., Kleefeld, A., & Kim, O. B. (2016). C<sub>4</sub>-dicarboxylate utilization in aerobic and anaerobic growth. *EcoSal Plus*, 7(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0021-2015
- van Diemen, P. M., Dziva, F., Stevens, M. P., & Wallis, T. S. (2005). Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. *Infect Immun*, 73(3), 1735-1743. doi: 10.1128/IAI.73.3.1735-1743.2005
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., . . . Klashinsky, S. (2001). Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J*, 42(9), 714-720.
- Vanaja, S. K., Springman, A. C., Besser, T. E., Whittam, T. S., & Manning, S. D. (2010). Differential expression of virulence and stress fitness genes between *Escherichia coli* O157:H7 strains with clinical or bovine-biased genotypes. *Appl Environ Microbiol*, 76(1), 60-68. doi: 10.1128/AEM.01666-09
- Vdsciences. Organogénèse Vertébrés. from <http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/organogenese/organognese-vertebres-10.html>
- Venegas-Vargas, C., Henderson, S., Khare, A., Mosci, R. E., Lehnert, J. D., Singh, P., . . . Manning, S. D. (2016). Factors associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. *Appl Environ Microbiol*, 82(16), 5049-5056. doi: 10.1128/AEM.00829-16
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., . . . Richard, Y. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol*, 93(3), 473-478.
- Vidovic, S., & Korber, D. R. (2016). *Escherichia coli* O157: Insights into the adaptive stress physiology and the influence of stressors on epidemiology and ecology of this human pathogen. *Crit Rev Microbiol*, 42(1), 83-93. doi: 10.3109/1040841X.2014.889654

- Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K., & Korber, D. R. (2011). Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of RpoS. *Int J Food Microbiol*, *146*(2), 163-169. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.018
- Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K., Xiong, H., & Korber, D. R. (2012). Heat acclimation and the role of RpoS in prolonged heat shock of *Escherichia coli* O157. *Food Microbiol*, *30*(2), 457-464. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.029
- Vilte, D. A., Larzabal, M., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B. C., Elizondo, A. M., . . . Mercado, E. C. (2011). Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with gamma-intimin C<sub>280</sub> and EspB proteins. *Vaccine*, *29*(23), 3962-3968. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.03.079
- Vlisidou, I., Dziva, F., La Ragione, R. M., Best, A., Garmendia, J., Hawes, P., . . . Stevens, M. P. (2006). Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, *74*(1), 758-764. doi: 10.1128/IAI.74.1.758-764.2006
- Vlisidou, I., Lyte, M., van Diemen, P. M., Hawes, P., Monaghan, P., Wallis, T. S., & Stevens, M. P. (2004). The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. *Infect Immun*, *72*(9), 5446-5451. doi: 10.1128/IAI.72.9.5446-5451.2004
- Vogeeler, P., Tremblay, Y. D., Jubelin, G., Jacques, M., & Harel, J. (2015). Biofilm-forming abilities of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections. *Appl Environ Microbiol*, *82*(5), 1448-1458. doi: 10.1128/AEM.02983-15
- Vogeeler, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, *5*, 317. doi: 10.3389/fmicb.2014.00317
- Vu-Khac, H., & Cornick, N. A. (2008). Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Vet Microbiol*, *126*(4), 356-363. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.023
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *44*(4), 957-970.
- 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*(6), 2081-2085. doi: 10.1128/JB.183.6.2081-2085.2001
- Wang, G., Zhao, T., & Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, *62*(7), 2567-2570.
- Wang, O., McAllister, T. A., Plastow, G., Stanford, K., Selinger, B., & Guan, L. L. (2017). Hindgut mucosa-associated microbiome interacting with host regulating *Escherichia coli* O157:H7 shedding in cattle. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.01738-17
- Wang, S., Deng, K., Zaremba, S., Deng, X., Lin, C., Wang, Q., . . . Zhang, W. (2009). Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*, *75*(19), 6110-6123. doi: 10.1128/AEM.00914-09
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., & Wood, T. K. (2013). Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ Microbiol*, *15*(6), 1734-1744. doi: 10.1111/1462-2920.12063
- Watanabe, Y., Ozasa, K., Mermin, J. H., Griffin, P. M., Masuda, K., Imashuku, S., & Sawada, T. (1999). Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect Dis*, *5*(3), 424-428. doi: 10.3201/eid0503.990313
- Wells, J. E., Berry, E. D., & Varel, V. H. (2005). Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, *71*(12), 7974-7979. doi: 10.1128/AEM.71.12.7974-7979.2005

- Wells, J. E., Kim, M., Bono, J. L., Kuehn, L. A., & Benson, A. K. (2014a). Meat Science and Muscle Biology Symposium: *Escherichia coli* O157:H7, diet, and fecal microbiome in beef cattle. *J Anim Sci*, *92*(4), 1345-1355. doi: 10.2527/jas.2013-7282
- Wells, J. E., Kim, M., Bono, J. L., Kuehn, L. A., & Benson, A. K. (2014b). MEAT SCIENCE AND MUSCLE BIOLOGY SYMPOSIUM: *Escherichia coli* O157:H7, diet, and fecal microbiome in beef cattle. *J Anim Sci*, *92*, 1345-1355.
- Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R., & Morris, G. K. (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*, *18*(3), 512-520.
- Wells, T. J., McNeilly, T. N., Totsika, M., Mahajan, A., Gally, D. L., & Schembri, M. A. (2009). The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environ Microbiol*, *11*(7), 1803-1814. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01905.x
- Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., . . . Schembri, M. A. (2008). EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol*, *10*(3), 589-604. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01479.x
- Wickham, M. E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B. K., Brown, N. F., . . . Finlay, B. B. (2006). Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J Infect Dis*, *194*(6), 819-827. doi: 10.1086/506620
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag
- Williams, M. L., Pearl, D. L., & Lejeune, J. T. (2011). Multiple-locus variable-nucleotide tandem repeat subtype analysis implicates European starlings as biological vectors for *Escherichia coli* O157:H7 in Ohio, USA. *J Appl Microbiol*, *111*(4), 982-988. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05102.x
- Wong, A. R., Pearson, J. S., Bright, M. D., Munera, D., Robinson, K. S., Lee, S. F., . . . Hartland, E. L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol*, *80*(6), 1420-1438. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x
- Wood, T. K. (2009). Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol*, *11*(1), 1-15. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01768.x
- Woodward, M. J., Gavier-Widen, D., McLaren, I. M., Wray, C., Sozmen, M., & Pearson, G. R. (1999). Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* O157:H7 strain A84. *Vet Rec*, *144*(17), 466-470.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., . . . Giron, J. A. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest*, *117*(11), 3519-3529. doi: 10.1172/JCI30727
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldana, Z., Ledesma, M. A., Puente, J. L., & Giron, J. A. (2009a). The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol*, *191*(1), 411-421. doi: 10.1128/JB.01306-08
- Xicohtencatl-Cortes, J., Saldana, Z., Deng, W., Castaneda, E., Freer, E., Tarr, P. I., . . . Giron, J. A. (2010). Bacterial macroscopic rope-like fibers with cytopathic and adhesive properties. *J Biol Chem*, *285*(42), 32336-32342. doi: 10.1074/jbc.M110.162248
- Xicohtencatl-Cortes, J., Sanchez Chacon, E., Saldana, Z., Freer, E., & Giron, J. A. (2009b). Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *J Food Prot*, *72*(7), 1531-1537.
- Xu, Y., Dugat-Bony, E., Zaheer, R., Selinger, L., Barbieri, R., Munns, K., . . . Selinger, L. B. (2014). *Escherichia coli* O157:H7 super-shedder and non-shedder feedlot steers harbour distinct fecal bacterial communities. *PLoS One*, *9*(5), e98115. doi: 10.1371/journal.pone.0098115
- Yang, Z., Kovar, J., Kim, J., Nietfeldt, J., Smith, D. R., Moxley, R. A., . . . Benson, A. K. (2004). Identification of common subpopulations of non-sorbitol-fermenting, beta-glucuronidase-negative *Escherichia coli* O157:H7 from bovine production environments and human clinical

- samples. *Appl Environ Microbiol*, 70(11), 6846-6854. doi: 10.1128/AEM.70.11.6846-6854.2004
- Younts-Dahl, S. M., Osborn, G. D., Galyean, M. L., Rivera, J. D., Loneragan, G. H., & Brashears, M. M. (2005). Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *J Food Prot*, 68(1), 6-10.
- Zaheer, R., Dugat-Bony, E., Holman, D. B., Cousteix, E., Xu, Y., Munns, K., . . . Selinger, L. B. (2017). Correction: Changes in bacterial community composition of *Escherichia coli* O157:H7 super-shedder cattle occur in the lower intestine. *PLoS One*, 12(2), e0172387. doi: 10.1371/journal.pone.0172387
- 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(2), 664-670. doi: 10.1086/315239
- Zhang, X. H., He, K. W., Zhang, S. X., Lu, W. C., Zhao, P. D., Luan, X. T., . . . Mao, A. H. (2011). Subcutaneous and intranasal immunization with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine*, 29(22), 3923-3929. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.007
- Zhao, B., & Houry, W. A. (2010). Acid stress response in enteropathogenic *gammaproteobacteria*: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol*, 88(2), 301-314. doi: 10.1139/o09-182
- Zhao, L., Tyler, P. J., Starnes, J., Bratcher, C. L., Rankins, D., McCaskey, T. A., & Wang, L. (2013). Correlation analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding and faecal bacterial composition in beef cattle. *J Appl Microbiol*, 115(2), 591-603. doi: 10.1111/jam.12250
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J., & Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol*, 61(4), 1290-1293.
- Zhao, T., Tkalcic, S., Doyle, M. P., Harmon, B. G., Brown, C. A., & Zhao, P. (2003). Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 66(6), 924-930.

**(480 références)**

## RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) représentant le quatrième agent responsable de toxi-infections alimentaires en Europe. La contamination par ces pathogènes résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires contaminés par les fèces de bovins, dont le tube digestif apparaît comme le principal réservoir naturel des EHEC. Ces pathogènes survivent dans le tractus digestif du ruminant, qui est porteur sain, et semblent bien adaptés à l'ensemble de cet écosystème complexe. Réduire le portage animal est une stratégie de choix afin de limiter les toxi-infections humaines à EHEC. L'objectif de cette thèse était d'approfondir les connaissances sur la physiologie et l'écologie des EHEC dans le tube digestif du bovin, une étape primordiale pour proposer, à terme, différentes stratégies visant à limiter le portage. L'analyse du transcriptome de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 a permis l'identification de voies métaboliques utilisées par les EHEC dans différents compartiments du tube digestif de l'animal. Certains sucres, dont ceux issus de la couche de mucus intestinal, et acides aminés ainsi que l'éthanolamine semblent représenter des substrats importants pour la survie des EHEC tout au long du tube digestif du bovin. Cette étude transcriptomique a également mis en évidence l'activation, par la souche EHEC, de nombreux systèmes de résistance à différents stress rencontrés dans le tube digestif bovin, dont les systèmes toxines/anti-toxines. L'activation de ces systèmes et la capacité à former des biofilms ont également été observées chez une souche STEC O157:H7 d'origine bovine, la souche MC2, dans des conditions mimant une persistance dans l'environnement. La caractérisation génomique et phénotypique permet de considérer cette souche comme pathogène et des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont indiqué que la souche MC2 était capable de persister dans le tube digestif du bovin mais aussi dans l'environnement de l'élevage. L'inoculation expérimentale de bovins par la souche MC2 a permis de mettre au point le premier modèle animal reproductible de portage et d'excrétion des STEC O157:H7 décrit en France. Ce modèle pourra être utilisé pour tester *in vivo* l'effet d'additifs alimentaires, tels que les probiotiques, afin de réduire le portage et l'excrétion de souches EHEC par les bovins, et donc limiter la contamination de l'Homme.

## ABSTRACT

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) which represent the fourth pathogen leading to foodborne illness in Europe. Contamination by these pathogens results mainly from the ingestion of food contaminated by feces of bovine, for which the digestive tract appears as the main natural reservoir of EHEC. These pathogens survive in the digestive tract of ruminants, which is healthy carriers, and seem well-adapted to this complex ecosystem. Reducing animal carriage is a strategy of choice to limit EHEC human infections. The aim of this thesis was to increase our knowledge on the physiology and ecology of EHEC in the digestive tract of bovine, a key step to propose, ultimately, different strategies to limit the carriage. Transcriptome analysis of the EHEC O157:H7 reference strain EDL933 allowed the identification of metabolic pathways used by EHEC in different compartments of the digestive tract of the animal. Some carbohydrates, including those from the intestinal mucus layer, and amino acids as well as ethanolamine appear to be important substrates for the survival of EHEC throughout the bovine digestive tract. This transcriptomic study also revealed the activation, by the EHEC strain, of several stress resistance systems encountered in the bovine digestive tract, including toxin/anti-toxin systems. The activation of these systems and the ability to form biofilms have also been observed in a bovine STEC O157:H7 strain, MC2 strain, under conditions mimicking persistence in the environment. Genomic and phenotypic characterization allows this strain to be considered as pathogenic and *in vitro* and *in vivo* studies indicated that the MC2 strain was able to persist in the bovine digestive tract but also in the farm environment. The experimental inoculation of bovines with the MC2 strain led to the development, for the first time in France, of a reproducible animal model of carriage and excretion of STEC O157:H7. This model could be used to test *in vivo* the effect of food additives, such as probiotics, in order to reduce the carriage and excretion of EHEC strains by bovines, and thus limit the contamination of humans.