



HAL
open science

**Virulence des Escherichia coli entérohémorragiques :
rôle central du monoxyde d'azote dans le devenir de
l'infection et identification de nouveaux déterminants
impliqués dans l'adaptation du pathogène à
l'environnement digestif**

Marion Gardette

► **To cite this version:**

Marion Gardette. Virulence des Escherichia coli entérohémorragiques : rôle central du monoxyde d'azote dans le devenir de l'infection et identification de nouveaux déterminants impliqués dans l'adaptation du pathogène à l'environnement digestif. Bactériologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC075 . tel-02954350

HAL Id: tel-02954350

<https://theses.hal.science/tel-02954350>

Submitted on 1 Oct 2020

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 :

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 02 Décembre 2019

MARION GARDETTE

Virulence des *Escherichia coli* entérohémorragiques :
rôle central du monoxyde d'azote dans le devenir de l'infection et
identification de nouveaux déterminants impliqués dans l'adaptation
du pathogène à l'environnement digestif

Rapporteurs	Josée Harel, PR, GREMIP, Saint-Hyacinthe, Canada Suzana Salcedo, CR, UMR5086 MMSB, Lyon, France
Examineurs	Stéphane Bonacorsi, PR, Service de Microbiologie Hôpital Robert-Debré, Paris, France Nicolas Barnich, PR, UMR1071 M2iSH, Clermont-Ferrand, France
Directeur de thèse	Grégory Jubelin, CR, UMR454 MEDiS, Clermont-Ferrand, France
Encadrante de thèse	Estelle Loukiadis, ISPV, UMR5557 Écologie Microbienne, Marcy-l'Étoile, France

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

UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
CLERMONT-FERRAND

**ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre :

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 02 Décembre 2019

MARION GARDETTE

Virulence des *Escherichia coli* entérohémorragiques :
rôle central du monoxyde d'azote dans le devenir de l'infection et
identification de nouveaux déterminants impliqués dans l'adaptation
du pathogène à l'environnement digestif

Rapporteurs	Josée Harel, PR, GREMIP, Saint-Hyacinthe, Canada Suzana Salcedo, CR, UMR5086 MMSB, Lyon, France
Examineurs	Stéphane Bonacorsi, PR, Service de Microbiologie Hôpital Robert-Debré, Paris, France Nicolas Barnich, PR, UMR1071 M2iSH, Clermont-Ferrand, France
Directeur de thèse	Grégory Jubelin, CR, UMR454 MEDiS, Clermont-Ferrand, France
Encadrante de thèse	Estelle Loukiadis, ISPV, UMR5557 Écologie Microbienne, Marcy-l'Étoile, France

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

REMERCIEMENTS

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 ensuite devenue UMR MEDiS sous la direction de Pierre Peyret et d'Annick Bernalier-Donadille, que je remercie également. J'ai également passé 7 mois dans l'équipe Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement (BPOE) de l'UMR Ecologie Microbienne, dirigée par Benoit Cournoyer, que je remercie pour son accueil.

Tous mes remerciements vont à mon directeur de thèse Grégory Jubelin, pour son encadrement et la confiance qu'il m'a accordée durant ce travail. Merci pour ta disponibilité au cours de ces 3 années, de m'avoir toujours guidée et soutenue pour mener à bien ce projet. Merci pour tous tes conseils scientifiques et techniques, et pour m'avoir apporté ton soutien autant lors des manip que lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci ensuite à Estelle Loukiadis, ma co-directrice, pour avoir encadré ma thèse et m'avoir fait confiance tout au long de ce projet. Merci également pour tes précieux conseils scientifiques.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, Josée Harel et Suzana Salcedo pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail ; Stéphane Bonacorsi et Nicolas Barnich pour leur participation en tant qu'examinateurs.

Je remercie Hang Nguyen et Stéphane Junot pour avoir fait partie de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos conseils scientifiques qui m'ont permis d'avancer.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe MEDiS. En particulier, merci Annie, pour ton aide technique et pour ta sympathie. Merci Valérie pour m'avoir accompagnée et rassurée lors des premières manip avec les souris. Katy, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton rire qui résonne toujours dans les couloirs du labo. Merci également à Gloglo pour ta gentillesse. Merci à mes colocs de bureau, Ruben et Phiphi, pour m'avoir toujours poussée à travailler plus (et à réduire le temps perdu sur les réseaux sociaux...), en particulier pendant la rédaction, merci pour votre bonne humeur et votre humour. Merci aux stagiaires de l'équipe, Sarah et Ines, pour votre soutien. Sarah, j'espère que tu trouveras vite ta voie, et Ines, je compte sur toi pour reprendre dignement le flambeau de la thésarde de l'équipe, profite bien de ces 3 années. Merci enfin à Floflo, Yacine, Chloé et Julien, merci pour tous ces moments passés au labo et en dehors, pour toutes ces discussions et débats inutiles, pour votre humour et votre soutien moral tout au long de ces 3 ans. Un merci particulier à

Julien, pour ton aide (plus ou moins efficace) dans toutes les manips, et surtout parce que je ne serai pas en train d'écrire cette thèse si tu n'avais pas été là, alors merci mamène !

Je remercie également toute l'équipe BPOE pour leur accueil pendant ces quelques mois. Merci à tous pour votre gentillesse. En particulier merci à la team du RU, Thomas, Marion et Sarah, je garde un très bon souvenir de nos conversations sérieuses et moins sérieuses. Merci Thomas, de m'avoir fait une place dans ton bureau, et pour tous tes précieux conseils scientifiques et autres. Merci aussi à Delphine, pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Merci à Thierry Marchal, du laboratoire d'Histologie de Vetagro Sup et à toute son équipe pour leur accueil, leur gentillesse, et le temps qu'ils m'ont accordé pour m'initier à l'Histologie.

A titre plus personnel, je souhaiterais d'abord remercier Cécile, pour avoir été là pendant ces 3 ans, pour m'avoir hébergée quand j'étais à la rue, et pour avoir toujours été fidèle au poste pour nos rendez-vous hebdomadaires, merci vieille meuf !

Merci ensuite à mes amis du Beaujolais, difficile de tous vous citer mais les week-ends passés au vert avec vous ont toujours été salvateurs. Un merci tout particulier à vous, Manon et Margaux. Votre soutien au quotidien m'a sans aucun doute permis d'arriver au bout de cette thèse, merci d'avoir toujours été là pour me remonter le moral malgré la distance.

Ensuite, comment ne pas citer ces inconnus, qui en l'espace de quelques semaines sont devenus une seconde famille. Les colocs du Petit Château d'abord, Johan, JB, Vincent, Charlyne, Yasmine et Thibaud, vous avez embelli mes soirées lyonnaises et vous avez réussi à me redonner le sourire dans une période compliquée. Mes colocs clermontois ensuite... Amélie, Antho, Bibiche, Matth, Mavava, Mimo et Paupau, cette dernière année a sans aucun doute été la meilleure et c'est entièrement grâce à vous. Merci pour tous ces moments partagés, j'emporte avec moi un tas de souvenirs inoubliables.

Enfin, merci à ma famille, celle qui est à mes côtés depuis 25 ans cette fois-ci. Merci à mes parents et mes frères qui m'ont soutenue dans tous les projets qui m'ont menée ici aujourd'hui, et qui ont toujours été présents pendant ces 3 années. Et pour finir, une pensée pour ma petite mamie. Tu étais là quand j'ai commencé cette aventure, j'aurai aimé que tu sois présente pour me voir franchir la ligne d'arrivée, tu me manques.

merci

Sommaire

Liste des Tableaux	5
Liste des Figures	6
Liste des Abréviations.....	7
CONTEXTE DU PROJET	10
REVUE DE LITTÉRATURE	14
Partie I : Le Monoxyde d'Azote - NO	15
I. Propriétés biochimiques du NO	15
1. Réactions avec l'oxygène et ses dérivés	15
2. Réaction avec les métaux de transition et clusters Fer-Soufre.....	16
3. Réaction avec les noyaux aromatiques.....	17
4. Réaction avec les thiols	17
5. Réaction avec les acides nucléiques et les lipides	18
II. Fonctions biologiques du NO chez l'Homme	18
1. En concentrations physiologiques	19
a) NO et système cardio-vasculaire	19
b) NO et système nerveux central	20
c) NO et système gastro-intestinal	20
2. En concentrations pathophysiologiques.....	20
a) Effets bénéfiques : rôle du NO dans la réponse immunitaire	20
b) Effets délétères : implication du NO dans les pathologies humaines.....	22
III. Sources de NO dans l'organisme	23
1. Les NO synthases.....	23
a) NOS constitutives eNOS et nNOS	24
b) NOS inductible iNOS	25
2. Système orogastrique Nitrate-Nitrite-NO	27
IV. Adaptation des bactéries au stress NO.....	29
1. Régulateurs transcriptionnels impliqués dans la réponse au NO	29
a) NorR	29

b) NsrR.....	30
c) DNR et NnrR.....	32
d) HcpR et NssR.....	33
e) Autres senseurs non spécifiques au NO.....	33
2. Systèmes de détoxification du NO.....	35
a) Hmp et autres hémoglobines.....	35
b) NorVW et NOR.....	36
c) NrfA.....	37
d) Hcp-Hcr.....	37
e) Autres systèmes de résistance au NO.....	38
Partie II : Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	41
I. Définitions et caractéristiques.....	41
II. Systèmes de classification.....	41
1. La phylogénie.....	41
2. Les pathovars.....	42
a) Les <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux - ExPEC.....	42
b) Les <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux - IPEC.....	44
3. Les sérogroupes et sérotypes.....	47
4. Les séropathotypes.....	48
III. Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques – EHEC.....	48
1. Voies de contamination.....	49
a) Réservoirs.....	49
b) Transmission.....	50
2. Manifestations cliniques chez l’Homme.....	51
a) Les symptômes intestinaux.....	51
b) Le syndrome hémolytique et urémique - SHU.....	52
c) Le purpura thrombotique et thrombocytopénique - PTT.....	52
3. Prévalence des infections à EHEC et épidémies.....	52
a) Surveillance des infections à EHEC.....	52

b) Épidémies associées aux EHEC	54
4. Moyens de lutte	56
Partie III : Pathogénicité des EHEC	59
I. Adaptation aux conditions environnementales du tractus digestif	59
1. pH acide.....	59
2. Présence de sels biliaires.....	61
3. Disponibilité en O ₂	62
II. Adhésion à l'épithélium intestinal	63
1. Le locus d'effacement des entérocytes - LEE.....	63
a) Le système de sécrétion de type III - T3SS	65
b) L'intimine	66
c) Effecteurs bactériens injectés via le T3SS	67
2. Facteurs d'adhésion non codés par le LEE	68
III. Synthèse des Shigatoxines	70
1. Structure et variants de Stx.....	70
2. Mode d'action des Stx.....	72
a) Translocation à travers l'épithélium intestinal.....	72
b) Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité.....	74
3. Régulation de la production des Stx	76
IV. Résistance à la réponse immunitaire de l'hôte : cas du NO	78
1. Mécanismes de résistance au NO	78
2. Effet du NO sur les facteurs de virulence des EHEC.....	79
V. Autres déterminants de la virulence	81
1. Les plasmides.....	81
a) pO157	81
b) pS88	83
2. Les îlots génomiques	84
VI. Modèles d'étude <i>in vivo</i> de la virulence des EHEC	85
1. Modèles murins.....	85

a) Souris	85
b) Rats	88
2. Primates non-humains	89
3. Autres animaux	89
HYPOTHESES DE TRAVAIL ET QUESTIONS DE RECHERCHE	92
RESULTATS	94
Chapitre I	95
<i>Identification et prévalence de gènes induits in vivo chez Escherichia coli entérohémorragique</i>	96
Chapitre II	115
<i>Interactions entre les Escherichia coli entérohémorragiques et le monoxyde d'azote au cours du processus infectieux</i>	116
<i>Rôle de l'opéron norVW dans la survie et la virulence des Escherichia coli entérohémorragiques durant l'infection</i>	144
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	172
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	182
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

Liste des Tableaux

Tableau 1. Régulateurs transcriptionnels de la réponse au NO	35
Tableau 2. Systèmes de détoxification du NO chez les bactéries.....	39
Tableau 3. Caractéristiques principales des trois bases de données MLST des <i>E. coli</i>	42
Tableau 4. Caractéristiques des pathovars d' <i>E. coli</i> responsables de syndromes diarrhéiques chez l'Homme (IPEC)	44
Tableau 5. Classification des EHEC en sérotypotypes.....	48
Tableau 6. Répartition des sérotypes d'EHEC les plus fréquemment impliqués dans les cas de SHU pédiatriques en France entre 2011 et 2015	53

Liste des Figures

Figure 1. Voies de production des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote.....	16
Figure 2. NO synthases : structure et synthèse de NO	24
Figure 3. Régulation de l'expression de la iNOS par différentes voies de signalisation	26
Figure 4. Modulation de l'activité de la iNOS par la disponibilité en L-arginine.....	27
Figure 5. Voies de production du NO par les bactéries.....	28
Figure 6. Représentation schématique simplifiée de la structure et de la régulation transcriptionnelle de NorR.....	30
Figure 7. Séquence consensus de fixation de NsrR.....	31
Figure 8. Représentation schématique du mécanisme de régulation transcriptionnelle du gène hmpA par NsrR	32
Figure 9. Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal.....	50
Figure 10. Évolution clinique des infections à EHEC	51
Figure 11. Nombre de cas de SHU pédiatriques et d'épidémies rapportés par le système de surveillance français entre 2007 et 2016	54
Figure 12. Représentation schématiques des systèmes AR2 (A) et AR3 (B)	61
Figure 13. Lésions d'attachement et d'effacement induites par une souche d'EHEC O157:H7 sur des cellules épithéliales rectales de mouton	63
Figure 14. Organisation génétique du LEE d'une souche EHEC O157:H7.....	64
Figure 15. Représentation schématique du système de sécrétion de type III chez les EHEC .	66
Figure 16. Structure tridimensionnelle de la Shigatoxine.....	71
Figure 17. Voies potentielles de passage des toxines Stx à travers l'épithélium intestinal humain.....	73
Figure 18. Voies de transport des Stx dans des cellules résistantes et sensibles	76
Figure 19. Induction de la production des Shigatoxines Stx1 et Stx2	77
Figure 20. Modèle proposé pour la régulation des opérons LEE1/4/5 par le NO	80
Figure 21. Représentation circulaire du plasmide pO157 d'une souche EHEC O157:H7	81
Figure 22. Représentation circulaire du plasmide pS88 de la souche d' <i>E. coli</i> S88.....	84

Liste des Abréviations

ASS	arginosuccinate synthase	GMPc	guanosine monophosphate cyclique
A/E	attachement et effacement	GTP	guanosine triphosphate
AAF	aggregative adhesine fimbriae	Hb	hémoglobine
Adi	arginine décarboxylase	HCP	haemoragic coli pilus
AEEC	attaching and effacing <i>E. coli</i>	Hcp	hybrid cluster protein
AIEC	<i>E. coli</i> adhérents invasifs	HTH	helix turn helix
AR	Acid resistance	IFN	interféron
BH4	tétrahydrobioptérine	IKK	kinase IκB
bNOS	bacterial nitric oxide synthase	IL-1	interleukin-1
CAT	cationic amino acid transporter	iNOS	inducible nitric oxide synthase
CD77	cluster of differentiation	IPEC	<i>E. coli</i> pathogènes intestinaux
CFA	colonization factor antigen	IRF-1	interferon regulatory factor 1
cNOS	constitutive nitric oxide synthase	IRP	iron regulatory protein
CRP	cAMP receptor protein	ikB	inhibitory κB
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse	JAK	janus kinase
DAF	complement decay-accelerating factor	kb	kilobases
DNIC	dinitrosyl-iron complexes	LEE	locus d'effacement des entérocytes
Eae	<i>E. coli</i> attaching and effacing	Ler	LEE-encoded regulator
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatifs	LPS	lipopolysaccharide
EBP	enhancer-binding protein	MLST	multilocus sequence typing
ECP	<i>E. coli</i> common pilus	MyD88	myeloid differentiation primary response 88
EDRF	endothelium derived relaxing factor	N ₂ OR	oxydes nitreux réductase
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques	NAR	nitrate réductase
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasifs	NF-κB	nuclear factor κB
eNOS	endothelial NOS	NIR	nitrite réductase
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogènes	Nle	non LEE encoded effector
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes	NMDA	N-methyl-D-aspartate
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux	nNOS	neuronal nitric oxide synthase
FAD	flavine adénine dinucleotide	NO	nitric oxide
FMN	flavine mononucléotide	NOR	NO réductase
Fur	ferric uptake regulator	NorR	NO-responsive regulator
GABA	acide γ-aminobutyrique	NOS	nitric oxide synthase
Gad	glutamatae décarboxylase	NsrR	NO ₂ ⁻ -responsive repressor
Gb3	globotriaosylcéramide	OI	O-island

pb	paire de bases	STAT-1 α	signal transducer and activator of transcription 1 α
PTT	purpura thrombotique et thrombocytopénique	STEC	<i>E. coli</i> producteurs de shigatoxines
RE	réticulum endoplasmique	Stx	shigatoxine
RNOS	reactive nitrogen oxide species	T3SS	système de sécrétion de type III
RNS	reactive nitrogen species	Tir	translocated intimin receptor
sCG	guanylate cyclase soluble	TLR4	toll-like receptor 4
SHU	syndrome hémolytique et urémique	TNF- α	tumoral nuclear factor α
SNC	système nerveux central	TRAF6	TNF- receptor associated factor 6
ST	sequence type	VTEC	<i>E. coli</i> producteurs de vérotoxines

CONTEXTE DU PROJET

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des agents pathogènes majeurs en santé publique. Ils sont responsables chaque année à travers le monde de milliers de cas de toxi-infections alimentaires chez l'Homme. Le principal réservoir des EHEC est le tube digestif du bovin, et l'infection humaine fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés, tels que la viande de bœuf hachée insuffisamment cuite, les produits au lait cru ou les végétaux crus. Les infections à EHEC peuvent conduire à des affections graves, comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU), mettant en jeu le pronostic vital des patients, et notamment les jeunes enfants. Le SHU est la principale cause d'insuffisance rénale aigüe chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays développés. Aucun traitement efficace n'existe à ce jour puisque l'antibiothérapie est déconseillée, car elle peut favoriser le développement du SHU. La prise en charge des patients est donc essentiellement symptomatique et nécessite une hospitalisation prolongée. Ainsi, les infections à EHEC sont un enjeu majeur en santé publique, mais également pour l'industrie agroalimentaire, victime des crises liées à la consommation d'aliments contaminés.

À l'échelle mondiale, plus de 200 sérotypes d'EHEC ont été identifiés. Cependant, seul un nombre restreint est régulièrement associé aux épidémies et aux cas de SHU : O157:H7, mais également O26:H11 ; O91:H21 ; O103:H2 ; O104:H4 ; O111:H8 ; O113:H21 ; O145:H28 ; O121:H19. En France, les épidémies les plus importantes ont eu lieu ces 15 dernières années, impliquant des souches O157 mais aussi non-O157, avec notamment deux épidémies en 2005 et deux en 2011, dont une associée à la souche EHEC O104:H4, responsable d'une épidémie massive, principalement en Allemagne (4137 cas d'infection, 896 cas de SHU et 50 décès). Ces épidémies démontrent que des aliments contaminés peuvent toujours se retrouver sur le marché alimentaire malgré les techniques modernes de détection des EHEC. Il est donc primordial et d'actualité de mettre en évidence des facteurs bactériens associés à la virulence des EHEC et de comprendre les interactions entre le pathogène et l'hôte afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à éliminer le pathogène et limiter l'apparition des SHU.

Ainsi, ce projet avait pour premier objectif d'identifier de nouveaux facteurs bactériens potentiellement impliqués dans le processus infectieux des EHEC. Le second volet du projet avait pour but de caractériser *in vivo* la réponse des EHEC au monoxyde d'azote (NO) qui intervient dans le processus de défense de l'hôte contre l'infection afin de mieux appréhender les interactions entre EHEC, NO et hôte.

Le manuscrit de thèse est organisé comme suit :

D'abord, une synthèse bibliographique divisée en trois parties replace ce travail de thèse dans son contexte scientifique. La première partie porte sur le monoxyde d'azote (NO) et présente ses diverses propriétés biochimiques et biologiques ainsi que les mécanismes de réponse au stress nitrosant mis en place par les bactéries de manière générale. La seconde partie est consacrée aux *E. coli* pathogènes en présentant les différents éléments de classification de ces souches et se concentre plus particulièrement sur les *E. coli* entérohémorragiques et notamment l'épidémiologie de ces infections. La troisième partie est dédiée aux différents facteurs responsables de la pathogénicité des EHEC et aux modèles *in vivo* disponibles actuellement pour l'étude de la virulence de ces souches en modèle complexe.

Les résultats expérimentaux sont ensuite abordés en deux chapitres et sont illustrés sous la forme de trois publications scientifiques. Le premier chapitre est consacré à la recherche de nouveaux facteurs bactériens potentiellement impliqués dans le processus infectieux des EHEC. Il contient un article publié dans le journal *Virulence* qui porte sur l'identification et l'analyse de la prévalence de gènes induits *in vivo* lors d'une infection à EHEC en modèle murin. Le second chapitre s'intéresse à l'étude de l'influence du stress nitrosant au cours du processus infectieux et contient deux articles. Le premier, soumis dans le journal *Gut Microbes*, étudie les interactions entre le NO et les EHEC *in vivo* et l'impact du NO sur le devenir de l'infection. Le second article, prochainement soumis dans *Environmental Microbiology*, porte sur l'étude du rôle de la NO réductase NorVW dans la survie et la virulence des EHEC au cours de l'infection.

Enfin, ce manuscrit se termine par une discussion générale dans laquelle sont exposées les perspectives de recherche, suivie de la liste des contributions scientifiques et communications réalisées au cours de la thèse.

REVUE DE LITTERATURE

Partie I : Le Monoxyde d'Azote - NO

Le NO est une molécule radicalaire largement présente dans les systèmes biologiques, possédant à la fois des effets bénéfiques et néfastes, et principalement associée aux métabolismes du fer et de l'oxygène. Dans les milieux biologiques, le NO est principalement synthétisé à partir de la L-arginine par plusieurs isoformes de l'enzyme NO synthase (NOS). Les propriétés biochimiques singulières du NO lui valent une implication dans des fonctions biologiques très variées, allant du rôle de molécule signal dans les cellules à des activités antimicrobiennes. Ainsi, le NO intervient dans des processus majeurs de différents systèmes chez l'homme tels que les systèmes circulatoires, nerveux ou encore immunitaires.

I. Propriétés biochimiques du NO

Le NO est un gaz radicalaire diatomique, composé d'un atome d'oxygène, d'un atome d'azote et d'un électron libre. La nomenclature exacte pour cette molécule est $\cdot\text{NO}$, mais pour des raisons de lisibilité, la dénomination NO a été utilisée dans l'ensemble de ce manuscrit. La présence d'un électron célibataire lui confère une forte réactivité avec de nombreuses espèces organiques et inorganiques. Le potentiel d'oxydoréduction du milieu environnant est déterminant pour l'oxydation du NO en cation nitrosonium (NO^+) ou sa réduction en anion nitrosyle (NO^-). La capacité du NO à partager son électron célibataire avec d'autres radicaux (ion superoxyde, radical tyrosyl), avec des espèces susceptibles d'intervenir dans des réactions radicalaires (oxygène moléculaire, thiols, phénols) ou encore avec des métaux de transition avides d'électrons (fer, cuivre) sont à l'origine de sa forte réactivité. L'ensemble de ces réactions confèrent au NO de nombreuses propriétés biochimiques et physiologiques.

1. Réactions avec l'oxygène et ses dérivés

Le NO réagit spontanément avec le dioxygène O_2 ou des dérivés comme le superoxyde O_2^- pour former des intermédiaires réactifs de l'azote (RNS) et de l'oxygène (ROS) (Wink and Mitchell, 1998). La formation de ces intermédiaires est biologiquement significative lorsque la concentration en NO est supérieure à $1 \mu\text{M}$. Ces molécules sont notamment le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les réactifs oxydants comme $\cdot\text{OH}$, le peroxyde d'azote ONOO^- et le dioxyde d'azote NO_2 (Jones et al., 2010) (Figure 1).

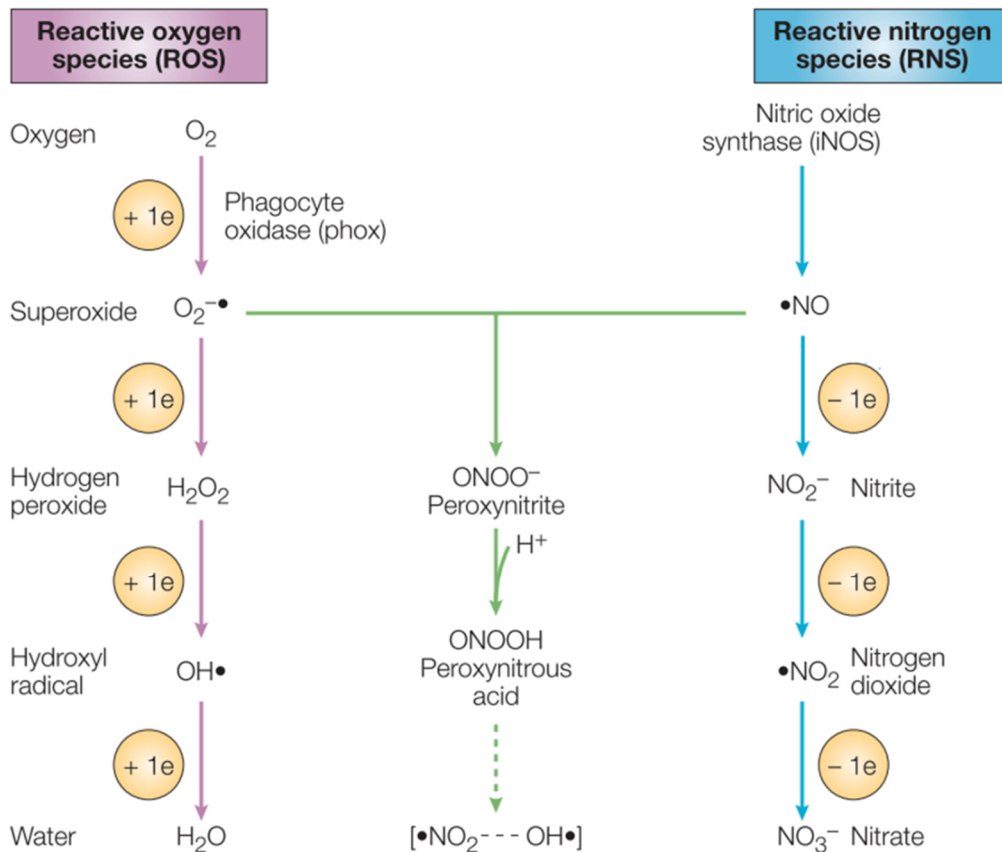


Figure 1. Voies de production des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote, d'après (Fang, 2004)

Chacune des molécules RNS et ROS a une localisation et une stabilité biologique qui lui est propre mais certaines peuvent agir simultanément dans des conditions biologiques appropriées. Les RNS et ROS interagissent avec une multitude de cibles cellulaires, notamment les thiols, les clusters fer, les tyrosines, les nucléotides et les lipides (Nathan and Shiloh, 2000).

2. Réaction avec les métaux de transition et clusters Fer-Soufre

Le NO peut se fixer à la plupart des métaux de transition, formant ainsi un complexe métal-nitrosyl DNIC (*dinitrosyl-iron complex*). Le NO se lie de façon réversible au fer ferreux (Fe^{2+}) ou fer ferrique (Fe^{3+}); avec une affinité plus importante pour le fer ferreux Fe^{2+} (Cooper, 1999). La stabilité des DNIC dépend de la nature du métal. Lorsque le groupement fer auquel se lie le NO est associé à une protéine comme l'hème notamment, la stabilité du complexe est augmentée. Par exemple, lorsqu'il est présent en faible concentration, le NO se lie réversiblement à la fraction Fe(II) du groupement hème de la guanylate cyclase, induisant ainsi une modification de la structure 3D de l'enzyme et donc son activation. En revanche, à forte concentration, le NO se lie irréversiblement au groupement hème, ce qui engendre son retrait de la protéine et donc l'inhibition de la fonction protéique (Fang, 1997). Par exemple, le NO inhibe la chaîne respiratoire mitochondriale en se fixant sur l'hème de la cytochrome-c

oxydase. Le NO peut également se lier à l'hémoglobine (Hb) pour former un complexe HbNO très stable, avec une affinité pour le NO cent fois supérieure à celle de O₂ (Angelo et al., 2008), qui permet le transport et la libération du NO à distance.

Le NO a également la capacité de se lier aux centres fer-soufre des protéines. Des études ont permis de montrer que le NO perturbe la configuration spatiale des clusters fer-soufre de certaines enzymes, inhibant ainsi leur activité. Plus précisément, l'interaction du NO avec la protéine régulatrice du fer (IRP, pour *iron regulatory protein*) et un régulateur post-transcriptionnel de la ferritine et de la transferrine lui permettent de contrôler les échanges cytosoliques de fer (Soum and Drapier, 2003).

En agissant sur le cluster fer-soufre, le NO inhibe par exemple l'aconitase du cycle de Krebs dans les cellules en général, et l'aconitase de *Burkholderia mallei*, entraînant un effet antimicrobien vis-à-vis de ce pathogène (Jones-Carson et al., 2008).

3. Réaction avec les noyaux aromatiques

La présence de NO peut engendrer la nitration de noyaux aromatiques par transfert de charges entre l'ion NO⁺ et le groupe aromatique donneur d'un électron ou par réaction avec ONOO⁻. Cette nitration peut affecter un acide aminé libre ou sous forme de résidu, intégré dans une chaîne polypeptidique. La nitration de la tyrosine, par exemple, induit sa transformation en 3-nitrotyrosine, qui est un marqueur de l'inflammation *in vivo*. Or, des études ont montré qu'il existait une corrélation entre l'augmentation plasmatique de cette 3-nitrotyrosine et le développement de maladies coronariennes chez l'homme : environ 10 fois plus de résidus tyrosine sont nitrosylés dans le plasma de patients souffrants de maladies coronariennes comparé à des individus sains (Shishehbor et al., 2003). Le NO pourrait également induire la nitration de la manganèse superoxyde dismutase, induisant une inhibition de son activité et une augmentation de la production de O₂⁻ et de ONOO⁻, qui seraient notamment impliqués dans les troubles neurologiques (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001).

4. Réaction avec les thiols

Le NO a la capacité de se fixer sur les groupements thiols des résidus cystéines par une réaction de S-nitrosylation, pour former des composés S-nitrosothiol (RSNO). Cette modification post-transcriptionnelle de la cystéine, ainsi que la réaction inverse de S-dénitrosylation, permettent de moduler l'activation et l'inactivation de nombreuses protéines, impliquées notamment dans les réponses immunitaires innées et acquises (Hernansanz-Agustín et al., 2013).

Les RSNO peuvent être générés par différentes réactions (Smith and Marletta, 2012). La principale est la réaction du NO avec NO₂ pour former l'anhydride nitreux N₂O₃, qui réagit ensuite directement avec le groupement thiol.

5. Réaction avec les acides nucléiques et les lipides

Les dommages à l'ADN sont causés par les RNS et ROS plutôt que par le NO en lui-même, et on distingue trois types de mécanismes : une altération directe de la structure, l'inhibition de la réparation de l'ADN et l'augmentation de la génération d'agents génotoxiques, comme l'H₂O₂ ou les agents alkylants, qui forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN, inhibant ainsi la réplication (Wink et al., 1991).

Certains RNS, comme N₂O₃, induisent une désamination des cytosines, adénines et guanines. Le peroxy-nitrite et le dioxyde d'azote NO₂ induisent entre autres des ruptures du brin d'ADN ou la formation de sites AP (apurinique/apyrimidique) (Fang, 1997; Juedes and Wogan, 1996). Le NO inhibe également les enzymes de réparation de l'ADN associée à la réparation de l'alkylation, appelées alkyles transférases (Durbach et al., 2003). Ces alkyles transférases contiennent des résidus cystéine et subissent donc le phénomène de S-nitrosylation (Schairer et al., 2012).

Pour finir, les dommages sur les lipides sont causés par le peroxy-nitrite ONOO⁻ et le dioxyde d'azote NO₂. Il a été montré que le peroxy-nitrite module la peroxydation des lipides dans les liposomes (Rubbo et al., 1994) et que cette peroxydation lipidique contribue, par exemple, à l'activité antimicrobienne induite par le NO (Deupree and Schoenfisch, 2009).

En conclusion, le NO grâce à sa structure radicalaire qui lui confère une forte réactivité, peut agir sur divers composés cellulaires et moléculaires, et ainsi avoir un effet positif ou négatif dans de nombreux processus biologiques. Son omniprésence dans l'organisme lui vaut une implication dans nombre de fonctions biologiques chez l'Homme.

II. Fonctions biologiques du NO chez l'Homme

Le rôle du NO dans les fonctions biologiques chez l'Homme est modulé par sa concentration : on distingue les réactions se produisant à faibles concentrations (nanomolaire), considérées comme « physiologiques » ; et celle à fortes concentrations (micromolaire) apparentées à des conditions « pathologiques » (Toledo and Augusto, 2012).

1. En concentrations physiologiques

a) NO et système cardio-vasculaire

Le rôle du NO a été décrit pour la première fois dans le système cardio-vasculaire. En effet, en 1980, Furchgott et Zawadzki, ont mis en évidence le rôle indispensable de l'endothélium dans la relaxation d'artères isolées, soumises à l'action de l'acétylcholine. Ils en ont déduit la présence d'un facteur responsable de la vasodilatation et sécrété par les cellules endothéliales, alors nommé EDRF (*endothelium derived relaxing factor*). Ce facteur a par la suite été identifié comme étant le NO (Ignarro et al., 1987). Le NO produit par ce type cellulaire diffuse à travers les membranes et pénètre dans les cellules musculaires lisses, où il active la guanylate cyclase soluble (sGC), en se liant au groupement hème de cette dernière, induisant la modification de sa structure 3D. Il y a alors exposition du site catalytique au GTP (guanosine triphosphate), le substrat de l'enzyme, qui peut alors être transformé en GMPc (guanosine monophosphate cyclique). Le GMPc a plusieurs rôles : il favorise notamment la vasodilatation, la biogenèse des mitochondries et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Clementi and Nisoli, 2005; Homer and Wanstall, 2002; Weissmann et al., 2000).

Les premiers travaux démontrant le rôle du NO dans le système cardio-vasculaire ont permis à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferris Murad d'obtenir le Prix Nobel de Médecine en 1998. Suite à cette découverte, de nombreuses avancées thérapeutiques ont eu lieu, concernant notamment les maladies cardio-vasculaires et respiratoires (Cannon, 1998). Le NO a ainsi été le premier gaz à usage médical, utilisé contre l'hypertension artérielle, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la bronchopneumonie chronique obstructive ou encore le syndrome d'hypertension artérielle pulmonaire du nouveau-né.

Par ailleurs, la voie métabolique NO/GMPc joue un rôle dans l'érection puisque le GMPc est important pour le maintien de la pression intracaverneuse du pénis. Or, il est dégradé par les phosphodiésterases. Ainsi, l'administration de molécules inhibitrices des phosphodiésterases, comme le sildénafil (Viagra®), va empêcher la dégradation du GMPc, via un effet NO-mimétique, et prolonger la vasodilatation et donc l'érection (Rosen and Kostis, 2003; Turko et al., 1999).

Enfin, le NO associé à des dérivés nitrogénés induit une production accrue de GMPc dans les plaquettes en augmentant l'activité de la guanylate cyclase. Le GMPc ainsi produit en grande quantité inhibe l'agrégation plaquettaire (Mellion et al., 1981) et présente donc un intérêt dans le traitement des thromboses (Alheid et al., 1987).

b) NO et système nerveux central

Le NO est considéré comme un messager biologique et/ou messager rétrograde et est impliqué dans plusieurs fonctions neurologiques, comme la neurogénèse, la mémoire et l'apprentissage. Il pourrait en particulier jouer un rôle dans la potentialisation à long terme ; phénomène d'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique favorisant la mémorisation. En effet, plusieurs études ont montré que l'inhibition de la synthèse de NO conduit à une diminution des capacités d'apprentissage (Böhme et al., 1993; Hölscher and Rose, 1992; Majlessi et al., 2008).

Ces effets physiologiques s'expliquent par l'action du NO sur les récepteurs glutamate-dépendants NMDA (N-méthyl-D-aspartate), qui sont essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique. Concernant le mécanisme d'action, le NO est produit en réponse à l'activation des récepteurs NMDA (Garthwaite et al., 1988), qui sont alors fortement perméables au sodium, potassium et calcium. Ce dernier pénètre dans les cellules et se fixe sur la calmoduline, formant ainsi un complexe qui va activer une enzyme responsable de la synthèse de NO (NO synthase). Le NO produit peut alors agir de façon rétrograde en bloquant les récepteurs NMDA, et ainsi avoir un impact négatif sur la mémoire et la plasticité synaptique (Manzoni et al., 1992).

c) NO et système gastro-intestinal

Dans la fonction gastro-intestinale, le NO agit comme neurotransmetteur pour réguler la relaxation des fibres musculaires lisses de l'intestin, nécessaire au péristaltisme. Comme dans le système cardio-vasculaire, son action est liée à la production de GMPc. En effet, des travaux ont montré que le NO, via la production de GMPc, induisait l'ouverture des canaux Na⁺/K⁺, entraînant la relaxation des muscles lisses au niveau du côlon (Benabdallah et al., 2008).

Le NO est également impliqué dans la régulation de la sécrétion du mucus gastrique. En conditions physiologiques, le NO est un médiateur endogène : il module l'intégrité des tissus et possède des propriétés gastro-protectrices. En effet, une étude a montré que l'administration d'un donneur de NO à des rats permet d'inhiber les lésions gastriques induites par l'administration d'éthanol (Konturek et al., 1998).

2. En concentrations pathophysiologiques*a) Effets bénéfiques : rôle du NO dans la réponse immunitaire*

Le NO est un effecteur important de la réponse immunitaire et est produit par les macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques matures et les lymphocytes T. Dans ce

contexte, il est synthétisé à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire, par une NO synthase inductible, la iNOS (cf. *Partie I.III.Sources de NO dans l'organisme*). Le NO intervient notamment dans la lutte contre les infections intestinales directement à travers ses propriétés antimicrobiennes mais également indirectement en régulant la réponse immunitaire innée (Bogdan, 2001).

La surexpression de la iNOS a été mise en évidence chez des patients atteints de tuberculose (Landes et al., 2015). Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que des souris déficientes du gène codant la iNOS sont plus sensibles aux infections bactériennes, prouvant que la production de NO par la iNOS est requise dans la réponse immunitaire (Alam et al., 2002; Bogdan, 2001; MacMicking et al., 1997; Poljakovic and Persson, 2003; Rajaram and Nelson, 2015). L'activité antimicrobienne du NO est notamment due à ses propriétés cytotoxiques. Un taux élevé de NO provoque des dommages à l'ADN, en induisant une cassure des brins d'ADN ou une désamination de l'adénine et de la guanine (Nguyen et al., 1992; Wink et al., 1991). Il est cependant nécessaire de préciser que dans plusieurs cas, l'effet cytotoxique du NO a été attribué à l'effet du peroxyde nitrosé, produit de la réaction entre NO et O_2^- , qui induit l'oxydation et la nitrosylation des nucléotides (Korkmaz et al., 2009; Niles et al., 2006). Le NO augmente également l'activité bactéricide du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit par les neutrophiles activés et les macrophages (Yadav et al., 2014). L'importance du NO dans les mécanismes de défense de l'hôte est en outre démontrée par le fait que certains pathogènes, comme *Mycobacterium avium*, sont capables d'inhiber l'activité de la iNOS lors du processus infectieux (Lamont et al., 2013) et possèdent divers systèmes de détoxification du NO (cf. *Partie I.IV.2.Systèmes de détoxification du NO*).

Le NO est également impliqué dans la défense de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Historiquement, le premier rôle décrit du NO dans la réponse immunitaire est d'ailleurs l'inhibition de l'induction et de la prolifération des cellules cancéreuses (Nathan, 1992). Plusieurs mécanismes ont été décrits *in vitro* pour expliquer les effets cytostatiques ou cytotoxiques du NO sur les cellules tumorales. On peut notamment citer l'inhibition d'enzymes essentielles pour la croissance cellulaire, comme les enzymes de la chaîne respiratoire (Bogdan et al., 2000), l'arrêt du cycle cellulaire (Pervin et al., 2001) ou l'induction du phénomène d'apoptose, par activation des caspases et accumulation dans le noyau du suppresseur de tumeur p53 (Messmer and Brüne, 1996). L'importance du NO comme agent antiprolifératif sur les cellules tumorales a également été démontré *in vivo* (Di Napoli et al., 1996; Wei et al., 2003).

b) Effets délétères : implication du NO dans les pathologies humaines

L'implication du NO dans les processus inflammatoires ou la mort cellulaire lui confère des effets bénéfiques notamment dans la lutte contre les pathogènes ou les cellules tumorales. Mais en cas de synthèse inadaptée du NO, ces mêmes propriétés peuvent conduire à des effets néfastes sur l'organisme.

Un des rôles les plus controversés du NO est son implication dans le cancer (Vannini et al., 2015). En effet, en contradiction avec les propriétés anti-tumorales décrites précédemment, il a été démontré que le NO favorise l'apparition de cancers en induisant notamment des mutations ponctuelles et des dommages à l'ADN et en inhibant les mécanismes de réparation (Wink et al., 1991, 1998). Il pourrait également engendrer une mutation sur p53, inhibant ainsi son activité de répresseur tumoral. De plus, le NO a plusieurs effets anti-apoptotiques; il inhibe par exemple directement les caspases dans certaines conditions (Choudhari et al., 2013). En outre, il favorise la progression des tumeurs en stimulant l'angiogenèse (Morbideilli et al., 2003).

De même, bien que le NO soit un facteur de lutte contre les pathogènes, il participe à l'immunosuppression observée lors de certaines infections et est ainsi responsable des troubles associés au choc septique (hypotension, hépatotoxicité, dysfonction cardiaque...) induit par les endotoxines bactériennes. Cet effet paradoxal du NO a été mis en évidence grâce à l'utilisation de souris déficientes de la iNOS. Une étude a montré que ces souris deviennent à la fois sensibles au protozoaire parasite du genre *Leishmania*, mais également résistantes au choc septique induit par le LPS (Wei et al., 1995). De même, il a été décrit que la production élevée de NO lors d'une infection expérimentale de souris par *Chlamydia psittaci* est bénéfique pour l'hôte lorsque la dose infectieuse est élevée, mais que le NO devient délétère lors d'une infection plus modérée mais chronique (Huang et al., 2002).

Ensuite, le NO est impliqué dans un certain nombre de maladies inflammatoires et auto-immunes (Lee et al., 2017). Par exemple, l'induction de la iNOS par les LPS et les cytokines pro-inflammatoires contribue aux maladies inflammatoires de l'intestin (Kolios et al., 2004; Tun et al., 2014). À forte concentration, le NO est aussi impliqué dans de nombreuses pathologies gastriques, telles que les ulcères ou les gastrites chroniques (Ohshima et al., 2006). Par ailleurs, une expression importante de la iNOS a été retrouvée dans des cas de fibrose pulmonaire, emphysème ou autres maladies respiratoires (Zhao et al., 2012).

Pour finir, une concentration non physiologique du NO dans le système nerveux central a été reliée à des pathologies neurodégénératives. En effet, une surproduction de NO liée à la

sur-activation des récepteurs NMDA a été mise en évidence dans des cas de maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Lipton et al., 2007; Steinert et al., 2010).

En conclusion, le NO est impliqué dans un très grand nombre de fonctions chez l'Homme et son effet, bénéfique ou délétère, est conditionné par sa synthèse qui doit avoir lieu au bon moment, au bon endroit et à la bonne concentration. Les systèmes de synthèse du NO ainsi que leur régulation ont donc une importance cruciale.

III. Sources de NO dans l'organisme

1. Les NO synthases

C'est seulement 10 ans après la découverte de son implication dans les systèmes biologiques que le mécanisme à l'origine de la synthèse du NO a été identifié. Trois isoformes d'une enzyme, la NO synthase, ont été identifiées (Bredt and Snyder, 1990). Ainsi, le NO est synthétisé par la nNOS (*neuronal NOS*), la iNOS (*inducible NOS*) et la eNOS (*endothelial NOS*) (Knowles and Moncada, 1994).

Tous les isoformes fonctionnent en tant qu'homodimères et synthétisent le NO à partir d'un substrat, la L-arginine, par une réaction en deux étapes. La présence des cofacteurs hème, tétrahydrobioptérine (BH₄), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) et calmoduline est nécessaire pour l'activité enzymatique. La L-arginine est d'abord hydroxylée en l'intermédiaire L-hydroxy-L-arginine qui est ensuite oxydé en L-citrulline et NO (Stuehr, 1999) (Figure 2).

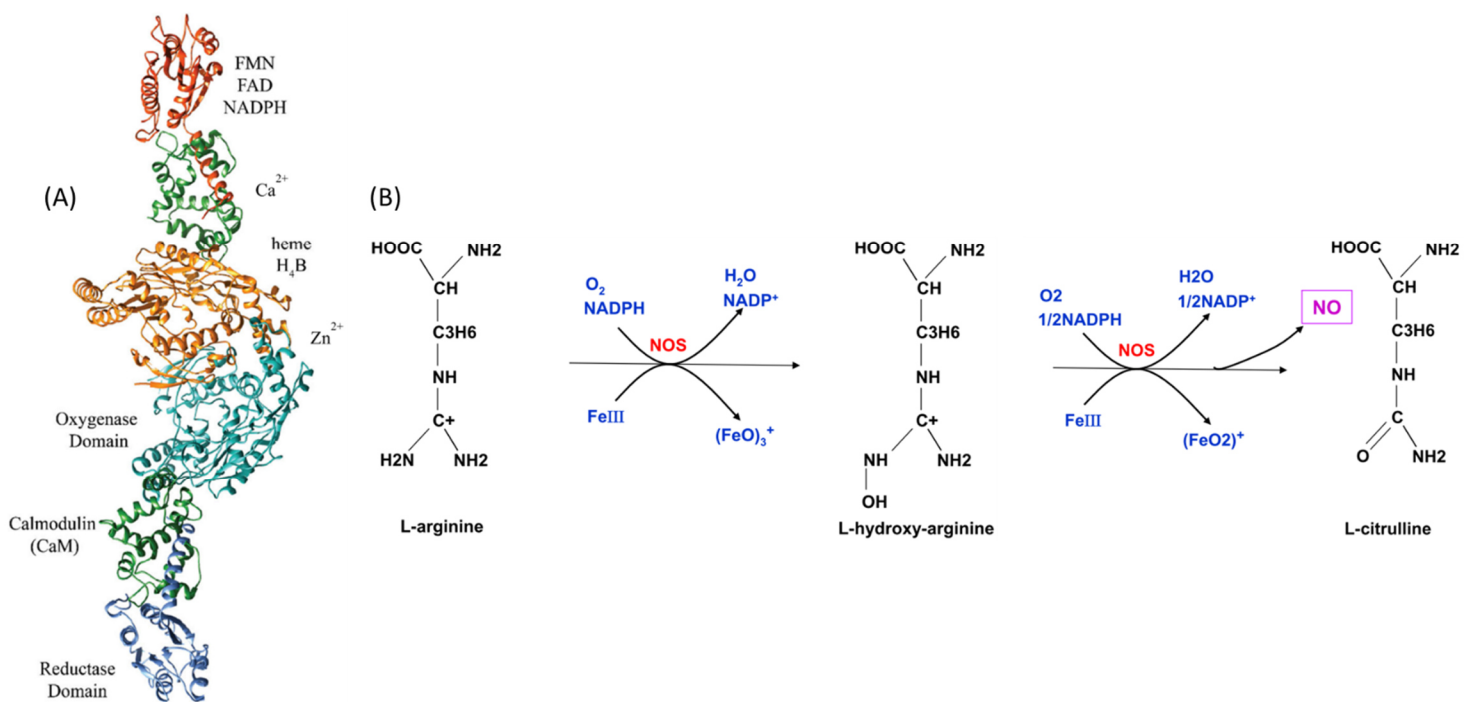


Figure 2. NO synthases : structure et synthèse de NO. (A) Structure tridimensionnelle des NOS (B) Réaction de synthèse enzymatique du NO

a) NOS constitutives eNOS et nNOS

Les NOS sont classées en deux catégories ; la première étant le groupe des cNOS (NOS constitutives) qui comprend la eNOS et la nNOS. Elles ont été classées ainsi en raison de leur expression constitutive. Et la nomenclature utilisée pour ces isoformes provient de leur distribution prédominante initialement identifiée dans certains tissus : la nNOS, ou NOS1 car codée par le gène *nos1*, a été identifiée dans les neurones et les cellules du cerveau ; la eNOS, ou NOS3 codée par *nos3*, est associée aux endothéliums. Cependant, plusieurs études ont montré par la suite que les NOS1 et NOS3 sont exprimées dans une plus grande variété de cellules, et régulées par de multiples facteurs tels que les cytokines et des facteurs microbiens. Ainsi, l'expression des cNOS peut en fait être induite dans certains types cellulaires (Dudzinski et al., 2006; Förstermann et al., 1998; Mattila and Thomas, 2014).

L'activité enzymatique des eNOS et nNOS dépend de la concentration en calcium dans le cytosol, ce qui permet un contrôle rapide et précis de la production de NO pour leur rôle dans la régulation de l'homéostasie vasculaire par la eNOS ou la neurotransmission par la nNOS (Bredt and Snyder, 1990; Lamas et al., 1992).

b) NOS inductible iNOS

La seconde catégorie est la iNOS (NOS inductible) ou NOS2, qui, contrairement aux cNOS, n'est pas exprimée dans les cellules en conditions normales sauf exception; elle est induite en réponse à un stimulus inflammatoire, comme les cytokines. Son activité enzymatique est indépendante du calcium et l'expression du gène *nos2* induit la production d'une quantité importante de NO, qui va avoir un effet sur l'inflammation et l'immunité de l'hôte (Nathan and Xie, 1994). La iNOS est exprimée dans de nombreux types cellulaires, tels que les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles, ou encore les cellules épithéliales, et elle est régulée principalement aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Cependant, comme pour les cNOS, le caractère inductible de la iNOS n'est pas exclusif, et une expression basale a été identifiée dans des cellules de l'épithélium pulmonaire ou colique, par exemple (Mattila and Thomas, 2014).

➤ Régulation transcriptionnelle de la iNOS

L'expression de la iNOS est soumise à une régulation transcriptionnelle, qui peut varier en fonction de l'hôte et du type cellulaire (Pautz et al., 2010). De manière générale, des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α (tumoral nuclear factor α), IL-1 (interleukin-1), et IFN- γ (interferon γ), ou des déterminants microbiens comme le LPS (lipopolysaccharide), déclenchent des voies de signalisation cellulaire se traduisant par l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression du gène *nos2*. Une des voies principales implique le facteur NF- κ B (*nuclear factor κ B*) (Figure 3). Le LPS active notamment le récepteur TLR4 (*toll-like receptor*) des macrophages, en association avec différentes protéines adaptatrices telles que TRAF6 (*TNF-receptor associated factor 6*) et MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) (Zhou et al., 2006). L'activation de TLR4 induit une cascade de réactions, qui provoque la phosphorylation de la kinase I κ B (IKK) et permet de lever l'inhibition du facteur nucléaire NF- κ B. Il y a alors translocation de NF- κ B, interaction avec le promoteur de la iNOS et expression de *nos2* (Figure 3, gauche) (Kleinert et al., 2003). D'autre part, la voie JAK/STAT-1 α est activée par l'interféron IFN- γ (Dell'Albani et al., 2001). Brièvement, la fixation de IFN- γ sur son récepteur induit la dimérisation de ce dernier et l'activation des JAK (*Janus kinases*), suivi par la phosphorylation de STAT-1 α . Celui-ci subit alors à son tour une dimérisation et une translocation vers le noyau, où il induit la synthèse de IRF-1 (*interferon regulatory factor 1*). C'est ensuite la liaison de IRF-1 à la région promotrice du gène iNOS qui permet d'activer la transcription du gène (Figure 3, droite).

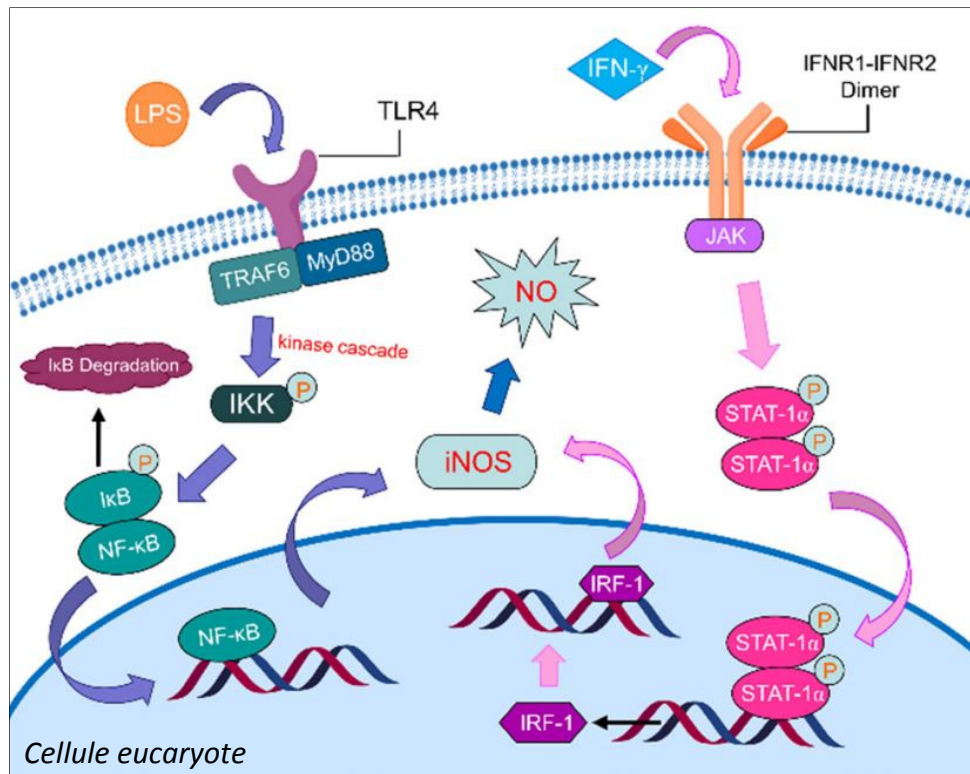


Figure 3. Régulation de l'expression de la iNOS par différentes voies de signalisation (Cinelli et al., 2019)

➤ Modulation de l'activité enzymatique de la iNOS

La production de NO par la iNOS est ensuite régulée au niveau de la réaction enzymatique en elle-même, notamment par le contrôle de la catalyse, la dimérisation et la disponibilité en cofacteurs et en substrats. D'abord, le stress oxydatif et la S-nitrosylation de la iNOS perturbent la structure du dimère (Milstien and Katusic, 1999; Mitchell and Marletta, 2005). Ensuite, le NO produit peut se lier au cofacteur hème et ainsi inhiber la réaction catalytique en empêchant la liaison avec O₂ et donc l'oxydation du substrat L-arginine (Wink and Mitchell, 1998). Par ailleurs, la iNOS est fonctionnelle sous forme homodimérique, et la formation de ce dimère dépend de plusieurs cofacteurs, notamment FAD, FMN, NADPH, et BH₄ (Kolodziejcki et al., 2004). Une étude a en effet montré que des lignées cellulaires produisant peu de BH₄ avaient une activité iNOS faible, et que la supplémentation en BH₄ augmentait la dimérisation de la iNOS (Tzeng et al., 1995).

Enfin, la disponibilité en L-arginine, le substrat de la iNOS, est également primordiale pour son activité (Figure 4). La L-arginine est impliquée dans le cycle de l'urée, dans lequel elle est convertie par l'arginase en ornithine et en urée, ce qui affecte l'activité de la iNOS puisqu'il y a compétition pour le même substrat. Il a en effet été démontré que l'inhibition de l'arginase

dans des macrophages de lapin et de rat avait un effet sur l'utilisation de la L-arginine par la iNOS (Hey et al., 1997). Par ailleurs, la disponibilité en L-arginine est contrôlée par les transporteurs CAT (*cationic amino acid transporter*) qui assurent son internalisation. Des travaux ont montré que la délétion du transporteur CAT2 réduisait la quantité de NO synthétisée dans des macrophages (Manner et al., 2003). Pour finir, la L-citrulline, coproduite avec le NO, peut être régénérée en L-arginine grâce à l'arginosuccinate synthase (ASS) (Mori and Gotoh, 2004). Cette synthèse est nécessaire pour assurer une quantité suffisante de L-arginine pour l'activité de la iNOS.

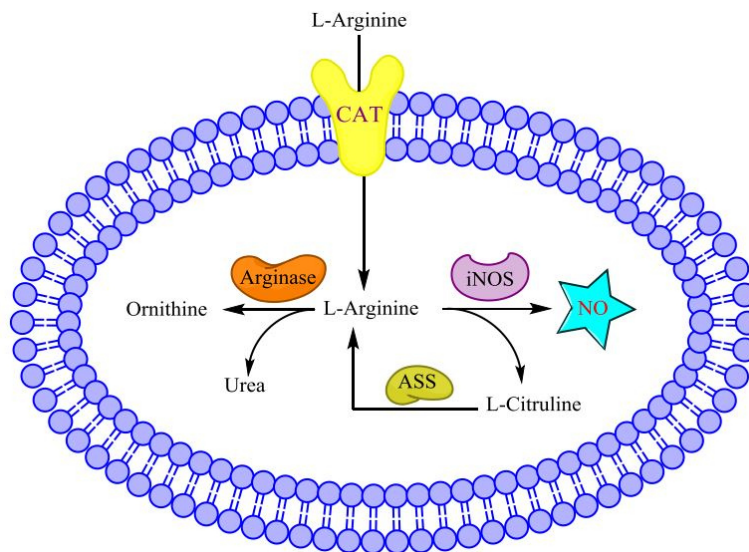


Figure 4. Modulation de l'activité de la iNOS par la disponibilité en L-arginine (Cinelli et al., 2019)

2. Système orogastrique Nitrate-Nitrite-NO

Bien que la iNOS soit la source majeure de NO dans l'organisme lors de la réponse immunitaire, il existe une autre source de NO, particulièrement intéressante dans le cadre de ce travail de recherche. C'est la production de NO à partir des nitrates et nitrites dans le système orogastrique par les microorganismes commensaux et pathogènes (Lundberg et al., 2008).

D'abord, le nitrate présent dans l'alimentation est réduit en nitrite par respiration anaérobie de certains microorganismes de la sphère buccale. Le nitrite est ensuite avalé et parvient dans la lumière gastrique où le pH est acide. Il subit alors une protonation et est transformé en acide nitreux (HNO_2), qui est ensuite spontanément dégradé en NO_2 , NO et H_2O . Cette source de NO, en plus des conditions de pH acide, pourrait contribuer à l'effet barrière de l'estomac contre les infections par des pathogènes gastro-intestinaux. Par

exemple chez *Vibrio cholerae*, il a été démontré qu'un mutant ne produisant plus la protéine de résistance au NO HmpA, présente une diminution de sa capacité de colonisation intestinale à cause du NO présent dans l'estomac (Davies et al., 2011; Stern et al., 2012). Il a également été démontré que le NO altère la capacité de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium dans la suite du manuscrit) à répondre au stress acide, suggérant que le NO et le pH acide agissent en synergie pour prévenir les infections gastro-intestinales (Bourret et al., 2008).

Une autre source possible de NO dans le système gastro-intestinal est le microbiote intestinal. En effet, de nombreuses bactéries sont capables de produire du NO *in vitro*, mais cette capacité de produire du NO dans l'intestin des mammifères n'a été que peu décrite. On sait cependant que certaines bactéries utilisent les nitrates et les nitrites comme source d'énergie en conditions anaérobies (respiration et dissimilation des nitrates), ce qui engendre la production de NO, oxyde nitreux (N₂O) et d'azote (N₂). Les enzymes respiratoires utilisées pour ces réactions sont les nitrates réductases NAR, les nitrites réductases NIR, les NO réductase NOR ou les oxydes nitreux réductases N₂OR (Kraft et al., 2011) (Figure 5A). Par ailleurs, certaines bactéries possèdent une NO synthase bactérienne, la bNOS, qui présente une grande similarité de séquence avec le domaine NOS-oxygénase des NOS présentes chez l'homme, sans avoir de domaine réductase (Crane et al., 2010) (Figure 5B).

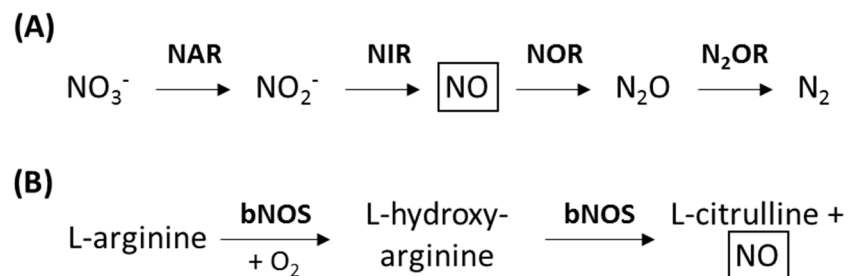


Figure 5. Voies de production du NO par les bactéries, d'après Bogdan, 2015

En conclusion, les voies de synthèse du NO dans l'organisme sont diverses. La plus importante reste la iNOS, responsable de la production de fortes concentrations de NO, observée en particulier lors d'une infection intestinale.

IV. Adaptation des bactéries au stress NO

Le NO, par sa forte réactivité et son omniprésence dans l'organisme, constitue un facteur de stress répandu pour les bactéries, pathogènes et non pathogènes. Ainsi, les bactéries ont développé plusieurs types de réponses complexes et spécifiques pour résister à ce stress. On distingue en particulier des facteurs de transcription senseurs de NO qui régulent l'expression de gènes codant des systèmes enzymatiques de détoxification.

1. Régulateurs transcriptionnels impliqués dans la réponse au NO

a) *NorR*

Un des premiers régulateurs transcriptionnels à avoir été décrit dans la réponse au NO est *NorR* (pour *NO-responsive regulator*) (Pohlmann et al., 2000). Il est activé à la fois en conditions aérobies et anaérobies (Hutchings et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2004). Cette protéine appartient à la famille des EBP (*enhancer-binding protein*), c'est-à-dire qu'elle active l'expression des promoteurs σ_{54} -dépendants (Bush et al., 2010; Bush and Dixon, 2012). Une caractéristique spécifique de cette famille de promoteurs est que l'hydrolyse de l'ATP par une protéine EBP, telle que *NorR*, est nécessaire pour l'initiation de la transcription. Les EBP contiennent souvent un système de régulation de l'activité ATPase par fixation d'un ligand ; dans le cas de *NorR*, ce ligand est le NO.

La structure de *NorR* contient trois domaines (Bush et al., 2011) : un domaine C-terminal HTH (*helix turn helix*) liée à l'ADN ; un domaine central AAA+ avec une activité ATPase qui interagit avec σ_{54} , et un domaine N-terminal régulateur GAF, contenant un centre fer non hémunique (Figure 6). Il a été démontré que le domaine GAF correspond au module senseur de NO. En effet, la délétion du domaine GAF a pour conséquence l'activation constitutive de la transcription *in vivo*, indépendamment de la présence de NO. Par ailleurs, c'est le centre Fe^{2+} du domaine GAF qui se lie avec le NO. En effet, la mutation de ce centre fer induit la perte de la fonction de *NorR* (D'Autréaux et al., 2005).

En absence de NO, l'activité ATPase est inhibée par une interaction directe entre le domaine N-terminal GAF et le domaine central AAA+, empêchant l'activation de l'ARN polymérase associée à σ_{54} (Bush et al., 2010). La liaison réversible du NO sur le centre fer du domaine GAF induit un changement de conformation, et la levée de la répression (Figure 6). Il y a alors hydrolyse d'ATP qui est couplée avec l'activation de la transcription (Bush et al., 2010; D'Autréaux et al., 2008; Tucker et al., 2006). *NorR* se lie spécifiquement à une séquence d'ADN correspondant à plusieurs motifs GT-N₇-AC successifs; plus précisément sur trois motifs chez *Escherichia coli* (Tucker et al., 2004). Cependant, l'absence d'un troisième site de liaison

pour d'autres promoteurs contrôlés par NorR, comme celui du gène *hmpA* chez *Vibrio cholerae*, suggère que ce motif triple-séquences n'est pas toujours nécessaire pour la régulation par NorR (Rodionov et al., 2005; Stern et al., 2012).

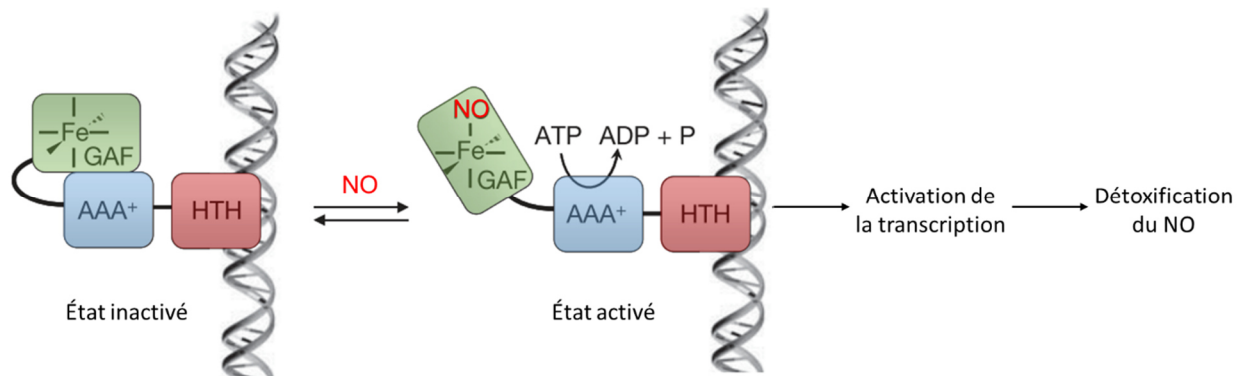


Figure 6. Représentation schématique simplifiée de la structure et de la régulation transcriptionnelle de NorR (D'Autréaux et al., 2005)

Enfin, NorR appartient au cluster de gènes *norRVW*. Ainsi, l'activation de NorR induit la transcription des gènes *norV* et *norW*, codant respectivement une flavorubrédoxine et une réductase associée, qui réduisent le NO en N_2O en anaérobiose (Hutchings et al., 2002) (*cf. Partie I.IV.2.Systèmes de détoxification du NO*).

b) *NsrR*

NsrR (pour *nitrite-sensitive repressor*) est un autre facteur transcriptionnel impliqué dans la réponse au NO qui régule l'expression de gènes impliqués dans la résistance au NO. Il a été découvert comme régulateur de gènes impliqués dans la dénitrification chez *Nitrosomonas europaea* (Beaumont et al., 2004). *NsrR* est retrouvé dans de nombreuses souches bactériennes et dans des niches écologiques diverses. En effet, une étude des systèmes de régulation impliqués dans le métabolisme du NO a mis en évidence des sites de fixation pour *NsrR*, ou des homologues de *NsrR*, dans plusieurs espèces bactériennes (Rodionov et al., 2005). Cette étude a également permis d'identifier de nombreux gènes potentiellement régulés par *NsrR*.

NsrR est une protéine homodimérique contenant un cluster fer-soufre. La structure de *NsrR* a été récemment caractérisée chez *Streptomyces coelicolor*, révélant l'existence d'un cluster [4Fe-4S] lié par trois résidus cystéine d'un monomère et par un acide aspartique spécifique du second monomère (Crack et al., 2015; Volbeda et al., 2017). Cependant, il est important de préciser que la nature du cluster fer-soufre varie en fonction de la souche

étudiée. Ainsi, NsrR chez *Nitrosomonas europaea* contient un cluster [2Fe-2S] (Isabella et al., 2009), alors que chez *Bacillus subtilis*, NsrR contient un cluster [4Fe-4S] (Yukl et al., 2008).

NsrR est un répresseur majeur de plusieurs gènes importants pour la réponse au NO, notamment chez *E. coli* avec les gènes *hmp*, *ytfE* (Bodenmiller and Spiro, 2006), *hcp-hcr* et *nrfa* (Filenko et al., 2007). Des études ont également montré que son activation était liée au NO et non aux nitrites, comme découvert initialement (Bodenmiller and Spiro, 2006; Nakano et al., 2006).

Le site de liaison de NsrR à l'ADN présente des variations en fonction de l'espèce bactérienne. De manière générale, le site de fixation à l'ADN de NsrR est palindromique car il contient deux motifs de 11 paires de bases (pb), répétés et inversés, séparés par une paire de base (Figure 7) (Bodenmiller and Spiro, 2006; Partridge et al., 2009; Rodionov et al., 2005). NsrR se lie à l'ADN sous forme de dimère, certainement avec un monomère par « demi-site », c'est-à-dire pour chaque motif de 11 pb (Tucker et al., 2008).

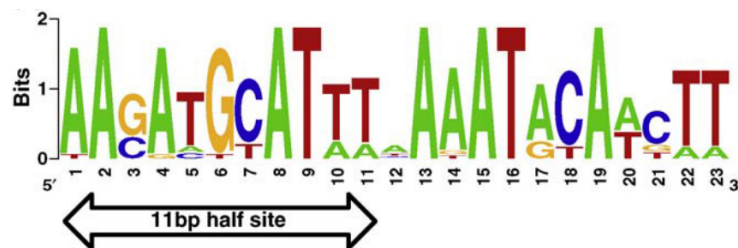


Figure 7. Séquence consensus de fixation de NsrR (Tucker et al., 2010)

Cette séquence a été déterminée par l'alignement des régions promotrices des cibles connues de NsrR chez 17 bactéries

NsrR est la plupart du temps un répresseur transcriptionnel. En absence de NO, NsrR se fixe à l'ADN et inhibe l'action de l'ARN polymérase et l'initiation de la transcription. En présence de NO, il y a formation d'un complexe dinitrosyl-fer (DNIC) au niveau du cluster fer-soufre, ce qui altère la conformation tridimensionnelle de la protéine qui perd sa capacité d'interaction avec l'ADN. La répression est alors levée et les gènes sont exprimés (Figure 8).

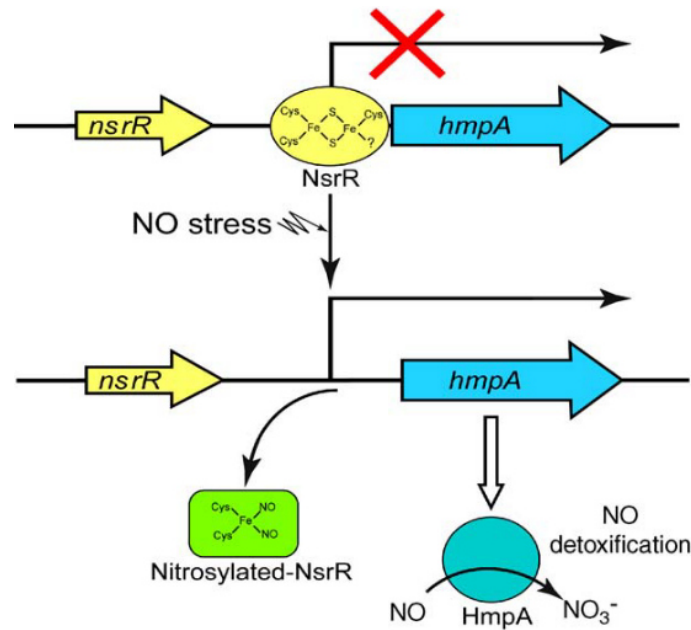


Figure 8. Représentation schématique du mécanisme de régulation transcriptionnelle du gène *hmpA* par *NsrR* (Tucker et al., 2010)

Chez *E. coli*, par exemple, *NsrR* régule l'expression de plus de 60 gènes (Partridge et al., 2009). Si certains d'entre eux sont bien sûr impliqués dans la détoxification du NO, d'autres interviennent dans diverses fonctions telles que l'adhésion, la dégradation de protéines, la mobilité, le transport membranaire, le métabolisme ou encore la réponse au stress (Partridge et al., 2009; Tucker et al., 2010).

c) *DNR* et *NnrR*

DNR et *NnrR* sont des facteurs de transcription de la famille des CRP/FNR qui, comme *NsrR*, induisent la transcription de gènes en réponse à un signal NO (Fleischhacker and Kiley, 2011). *NnrR* a été identifié pour la première fois chez *Rhodobacter sphaeroides* (Kwiatkowski and Shapleigh, 1996) et *Bradyrhizobium japonicum* (Mesa et al., 2003) et *DNR* chez *Pseudomonas aeruginosa* (Arai et al., 1995). Cependant, les mécanismes précis de liaison du NO et de transduction du signal ne sont pas aussi bien décrits que pour *NorR* et *NsrR*.

La structure de *DNR* a été définie sans les groupements prosthétiques (partie non protéique d'une molécule, comme l'hème) (Giardina et al., 2009), mais celle-ci suggère que le domaine senseur de *DNR* contient un fragment hème plutôt qu'un cluster fer-soufre ou un groupement fer non hémique. De plus, il a été montré que *DNR* peut se lier à l'hème *in vitro* (Rinaldo et al., 2012), et l'activation de la transcription des promoteurs *nor* par *DNR* est

inhibée dans les bactéries lorsque la synthèse hémique est perturbée (Castiglione et al., 2009).

Pour NnrR, aucun mécanisme spécifique pour la détection du NO n'a été décrit à ce jour. Les gènes cibles régulés par DNR et NnrR identifiés jusqu'à présent sont presque exclusivement impliqués dans la dénitrification (Arai et al., 2013; Rodionov et al., 2005; Trunk et al., 2009), suggérant que ces régulateurs sont spécifiquement impliqués dans l'activation de la dénitrification. Cependant, des travaux suggèrent que la synthèse d'hème est en partie régulée par NnrR et DNR (Arai et al., 2013; Rompf et al., 1998). Ce résultat, combiné avec l'hypothèse que l'hème est un groupement fonctionnel prosthétique de DNR, et possiblement de NnrR, suggère que ces deux régulateurs pourraient avoir un rôle comme senseur de NO.

d) *HcpR et NssR*

HcpR et NssR sont deux autres membres de la famille CRP/FNR, régulateur de la réponse au NO. Initialement, HcpR a été identifié, lors d'une analyse *in silico*, comme régulateur du gène *hcp* (voir IV.2. Systèmes de détoxification du NO) et de gènes impliqués dans la réduction du sulfate et du nitrate (Rodionov et al., 2004, 2005). Son rôle dans la régulation de *hcp* a été confirmé chez *Porphyromonas gingivalis*, un pathogène responsable d'infections bucco-dentaires, chez lequel la délétion de *hcpR* induit une hypersensibilité au NO (Lewis et al., 2012). Cependant, ce régulateur n'a pas été davantage étudié et sa structure précise n'est donc pas connue.

NssR a été identifié chez *Campylobacter jejuni*. Il régule l'expression de la globine Cgb, qui est importante pour la résistance au NO de ce microorganisme. NssR est un activateur, puisque la délétion du gène codant NssR induit un arrêt de la transcription du gène cible (Elvers et al., 2005). En outre, contrairement à la plupart des autres régulateurs, la fixation du NO à NssR ne semble pas avoir d'impact sur la liaison à l'ADN, suggérant un mécanisme indirect de senseur de NO (Smith et al., 2011).

e) *Autres senseurs non spécifiques au NO*

Il existe d'autres régulateurs transcriptionnels dont la fonction est altérée en présence de NO. Cependant, le NO n'est pas considéré comme étant le signal primaire de ces facteurs de transcription qui répondent à d'autres signaux comme le fer ou l'oxygène.

FNR appartient à la famille CRP/FNR et contient un cluster [4Fe-4S] (Khoroshilova et al., 1997; Lazazzera et al., 1996). Il régule l'activation de plus de 100 promoteurs et joue un rôle important dans l'adaptation entre métabolismes aérobies et anaérobies, en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation du carbone, la synthèse nucléotidique ou le

transport (Constantinidou et al., 2006; Grainger et al., 2007; Kang et al., 2005). Par ailleurs, il régule des gènes impliqués dans la détoxification du NO comme *hcp* ou *hmp* (Corker and Poole, 2003; Poole et al., 1996).

Fur (pour *ferric uptake regulator*) est également un régulateur dont l'une des fonctions est la réponse au NO. Fur est largement conservé et régule les promoteurs de gènes impliqués dans la fixation du fer. Une étude chez *Salmonella Typhimurium* a montré que Fur pourrait directement réguler *hmp* en se liant à son promoteur (Crawford and Goldberg, 1998). De plus, l'expression de *hmp* et d'autres gènes impliqués dans la réponse au NO est fortement dépendant de la présence de Fur ou de la chélation du fer (Mukhopadhyay et al., 2004), suggérant un lien important entre le niveau de fer dans les cellules et la réponse au NO. L'interaction avec le NO induit la formation de DNIC et entraîne la dissociation entre Fur et l'ADN (D'Autréaux et al., 2002, 2004).

Un autre système senseur de NO est l'opéron SoxRS. SoxR est le premier régulateur transcriptionnel à avoir été mis en évidence dans la réponse au NO. L'activation de SoxR induit la transcription du gène *soxS*, dont le produit SoxS induit à son tour l'expression des gènes du régulon SoxRS (Hidalgo and Demple, 1994). SoxR est composé d'un cluster [2Fe-2S] qui peut être oxydé par O_2^- et sur lequel se fixe le NO. Une fois le NO fixé, SoxR favorise sa détoxification (Hyduke et al., 2007). Cependant, il est important de préciser que, bien que ces protéines aient la capacité d'être activées par un donneur de NO exogène ajouté dans le milieu de culture *in vitro* (Justino et al., 2005), leur activation par des concentrations physiologiques de NO n'a pas été démontrée.

Enfin, OxyR est un activateur transcriptionnel, qui appartient à la famille des protéines LysR. Il est généralement retrouvé sous forme de dimère ou de tétramère (Choi et al., 2001). Chacun des monomères contient un groupement thiol qui fixe le NO. Cette liaison engendre une modification de conformation permettant la fixation d'OxyR sur l'ADN. OxyR induit ainsi la transcription de nombreux gènes, notamment impliqués dans la protection contre l'oxydation comme *oxyS*, qui est impliqué dans la réparation de l'ADN (Kim et al., 2002).

L'ensemble des régulateurs transcriptionnels induits lors d'un stress NO sont listés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Régulateurs transcriptionnels de la réponse au NO (Stern and Zhu, 2014)

Régulateur	Régulation	Site actif	Bactéries
NorR	Activateur	Fer non héminique	<i>E. coli</i> ; <i>V. cholerae</i> ; <i>S. Typhimurium</i>
NsrR	Répresseur	Cluster [4Fe-4S] ou [2Fe-2S]	<i>E. coli</i> ; <i>N. europea</i> ; <i>N. meningitides</i> ; <i>N. gonorrhoeae</i> ; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>S. coelicolor</i>
NnrR	Activateur	Non connu	<i>R. sphaeroides</i> ; <i>B. japonicum</i>
DNR	Activateur	Fer héminique	<i>P. aeruginosa</i>
HcpR	Activateur	Non connu	<i>E. coli</i> ; <i>P. gingivalis</i>
NssR	Activateur	Non connu	<i>C. jejuni</i>
FNR	Répresseur ou activateur	Cluster [4Fe-4S]	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhi</i> ; <i>S. dysenteriae</i> ; <i>Y. pestis</i> ; <i>V. cholerae</i>
Fur	Répresseur	Fer non héminique	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>V. cholera</i> ; <i>Y. pestis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>N. meningitidis</i> ; <i>B. subtilis</i>
SoxRS	Activateur	Cluster [2Fe-2S]	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>
OxyR	Activateur	Thiol	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>C. difficile</i>

2. Systèmes de détoxification du NO

L'ensemble des régulateurs transcriptionnels, listés dans le Tableau 1, permet donc de moduler l'expression d'un ensemble de gènes en réponse à la présence de NO dans l'environnement, conduisant notamment à la mise en place de systèmes de détoxification.

a) Hmp et autres hémoglobines

L'un des systèmes de détoxification du NO le mieux caractérisé à ce jour est la flavohémoglobine Hmp. Elle a été identifiée chez plusieurs bactéries pathogènes, telles que *Escherichia coli* (Hausladen et al., 1998), *Salmonella Typhimurium* (Bang et al., 2006), *Vibrio cholerae* (Stern et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Arai et al., 2005) ou encore *Staphylococcus aureus* (Richardson et al., 2006). C'est une NO dioxygénase codée par le gène *hmpA* dont l'expression est induite en réponse à la présence de NO, de NO₂⁻ et de NO₃⁻. Au niveau structural, elle est composée de trois domaines : un domaine globine, contenant un site hème actif, un domaine oxydoréductase, et un domaine FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide*).

Hmp joue un rôle important dans la résistance au NO en conditions aérobies, en catalysant l'oxydation du NO en nitrate (Gardner and Gardner, 2002). L'importance de Hmp dans la protection contre le NO produit par les macrophages a également été démontrée

(Gilberthorpe et al., 2007). L'expression de *hmpA* est réprimée par NsrR et par FNR. La régulation par FNR implique que *hmp* peut être surexprimé suite à un stress NO en conditions microaérobies et anaérobies (Cruz-Ramos et al., 2002) puisque l'oxygène induit une destruction du cluster fer-soufre de FNR (Khoroshilova et al., 1997). En anaérobiose, Hmp réduit le NO en oxyde nitreux mais la vitesse de cette réaction est faible (Kim et al., 1999).

En plus de la flavohémoglobine Hmp, il existe d'autres variants de l'hémoglobine ayant une fonction similaire. On peut par exemple citer la Cgb, identifiée chez *Campylobacter jejuni*, qui a une structure similaire à Hmp, à l'exception du domaine flavine ou oxydoréductase. Elle est importante dans la résistance au stress NO chez cette bactérie malgré l'absence de partenaire d'oxydo-réduction pour recycler l'hème ferreux (Tinajero-Trejo et al., 2013).

D'autre part, chez *Mycobacterium tuberculosis*, chez qui la résistance au NO est critique pour la virulence, le mécanisme de détoxification du NO prédominant est une hémoglobine tronquée, la HbN (Pathania et al., 2002). Comme Cgb, HbN ne possède pas le domaine flavoréductase, et c'est sûrement la liaison transitoire avec un autre élément qui permet l'activation du site hémoglobine.

b) *NorVW* et *NOR*

L'opéron *norVW* code une flavorubrédoxine (*norV*) et sa NADH:flavorubrédoxine réductase (*norW*) associée. Les flavorubrédoxines sont constituées d'un domaine FMN, d'un site fer non héminique, correspondant au domaine rubrédoxine, et d'un site catalytique fer actif (Gomes et al., 2000). Le système NorVW constitue une NO réductase, qui réalise à la fois l'oxydation de NADH et la réduction du NO. L'oxydation de NADH par NorW induit un transfert d'électron au domaine rubrédoxine de NorV (Gomes et al., 2002). Les électrons atteignent le site catalytique de NorV, ce qui permet la réduction du NO en oxyde nitreux N₂O.

L'activité NO réductase de NorVW a été identifiée chez *Escherichia coli*, comme une activité indépendante de Hmp et sensible au dioxygène (Gardner and Gardner, 2002). Chez *E. coli*, la délétion de *norVW* induit une diminution du taux de survie en présence de macrophages, due à leur production de NO (Baptista et al., 2012), ce qui suggère un rôle de NorVW dans le processus infectieux. De plus, l'importance de NorV dans la résistance au NO a également été démontrée *in vitro* en anaérobiose chez *S. Typhimurium* (Mills et al., 2008). Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez *E. coli* O157:H7 on trouve deux formes du gène *norV* : une forme intacte ou un gène délété de 204 pb conduisant à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (Gardner et al., 2002). Les souches exprimant la forme intacte de *norV* possèdent une capacité de survie accrue dans les macrophages, grâce à une

détoxification du NO plus importante que celle observée avec les souches produisant la forme tronquée de NorV (Shimizu et al., 2012).

Les NO réductases NOR se distinguent de la flavorubrédoxine NorV structurellement et fonctionnellement. Mais, de la même façon, elles catalysent la transformation du NO en N₂O (Hino et al., 2012). Dans le cas des NOR, les électrons proviennent du cytochrome c (dans le cas des cNOR) ou de quinols (pour les qNOR). De plus, les complexes NOR possèdent un site actif distinct, composé d'un centre fer dinucléaire avec une partie hème et une partie non hème (Janneke Hendriks et al., 1998). Les complexes NOR pourraient être considérés comme ayant un rôle « physiologique » plutôt qu'une implication dans la réponse au stress NO puisqu'ils sont souvent co-transcrits avec des enzymes dénitrifiantes. Cependant, il a été démontré chez *Moraxella catarrhalis* (Wang et al., 2011) et *Neisseria meningitidis* (Anjum et al., 2002) que la cNOR était importante pour la résistance à un stress NO exogène, suggérant son implication dans la réponse au stress.

c) *NrfA*

La cytochrome c nitrite réductase NrfA est une nitrite réductase périplasmique. La fonction primaire de cette enzyme est la conversion des nitrites en ammonium. Seulement, dans certaines conditions, ce processus pourrait aussi réduire la concentration en NO en limitant la décomposition pH-dépendante des nitrites en NO (Einsle, 2011). Son mécanisme d'action est différent de celui des nitrites réductases Nir présentes chez les bactéries dénitrifiantes qui convertissent les nitrites en NO. Il a été montré *in vitro* que NrfA ou ses homologues sont capables de réduire les nitrites en ions ammonium et de produire des intermédiaires qui permettent entre autres la consommation du NO (Oliver Einsle et al., 2002). Le rôle de NrfA dans la détoxification du NO a été démontré en observant une inhibition de croissance de mutants NrfA chez *E. coli* en conditions anaérobies (Mills et al., 2008; Poock et al., 2002), associée à une diminution de la réduction du NO (Clarke et al., 2008). Le rôle de NrfA dans la résistance au stress NO a également été démontré chez *Campylobacter jejuni* (Pittman et al., 2007) et *Wolinella succinogenes* (Kern et al., 2011) mais aucun lien direct n'a pu être mis en évidence avec la pathogénicité des souches. Enfin, l'expression de *nrfA* est réprimée par NsrR principalement (Filenko et al., 2007).

d) *Hcp-Hcr*

Les gènes *hcp* et *hcr* codent la protéine Hcp (pour *hybrid cluster protein*) et la réductase NADH-dépendant Hcr associée, qui catalysent la transformation du NO en N₂O. La protéine Hcp contient 2 types de clusters fer-soufre : un cluster hybride [4Fe-4S-2O] et un cluster [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (van den Berg et al., 2000). Chez *E. coli* en conditions anaérobies, Hcp est

réprimée par NsrR et positivement régulée par FNR (Filenko et al., 2007). La fonction de Hcp et son rôle dans la détoxification du NO n'ont été décrits que récemment. Wang et al. en 2016 ont démontré chez *E. coli* que Hcp a une haute affinité pour le NO puisqu'elle est activée par des concentrations en NO plus faibles que celles nécessaires pour l'activation de NorV. Une autre étude a confirmé cette observation et permis de mettre en évidence une action complémentaire des enzymes détoxifiantes NorVW, Hmp et Hcp en fonction de la concentration en NO (Shimizu et al., 2019) ; Hcp étant impliqué dans la détoxification du NO lorsqu'il est présent en faible concentration.

e) *Autres systèmes de résistance au NO*

D'autres mécanismes existent chez les bactéries pour résister à l'inhibition causée par le NO sans forcément l'éliminer. Parmi eux, la protéine YtfE est la première à avoir été identifiée comme importante dans la résistance au stress NO chez *E. coli* (Justino et al., 2005). Il a été démontré que YtfE joue un rôle dans la réparation des clusters fer-soufre des protéines (Justino et al., 2007) Ce rôle est lié à la présence d'un centre di-fer non hémunique dans sa structure (Todorovic et al., 2008).

Deux autres facteurs semblent impliqués dans la réparation des dommages causés par le NO sur les clusters fer-soufre : DnrN chez *Neisseria gonorrhoeae* et ScdA chez *Staphylococcus aureus* (Overton et al., 2008). Il a été montré que ScdA est suffisant pour compenser les dommages observés dans des mutants *ytfE*, confirmant l'importance de la réparation des clusters fer-soufre dans la résistance bactérienne au NO.

Enfin, NnrS est une protéine membranaire qui a été décrite comme impliquée dans la résistance au NO chez *Vibrio cholerae* (Stern et al., 2013). Son mécanisme d'action n'est pas connu mais il semble qu'elle protège surtout les protéines fer-soufre contre l'inhibition par le NO.

L'ensemble des systèmes de détoxification du NO présentés ci-dessus est résumé dans le Tableau 2.

Tableau 2. Systèmes de détoxification du NO chez les bactéries (Stern and Zhu, 2014)

Enzyme	Site actif	« Substrats »	« Produits »	Bactéries
Hmp	Hème	NO	NO ₃ ⁻ , N ₂ O	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhimurium</i> ; <i>V. cholerae</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i>
NorVW	Centre fer non hème	NO	N ₂ O	<i>E. coli</i> ; <i>S. Typhi</i>
NOR	Centre fer dinucléaire (hème et non hème)	NO	N ₂ O	<i>M. catarrhalis</i> ; <i>N. meningitidis</i>
NrfA	Hème	NO, NH ₂ OH, NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	<i>E. coli</i> ; <i>C. jejuni</i> ; <i>W. succinogenes</i>
Hcp	Cluster hybride [4Fe- 4S-2O] + cluster [2Fe- 2S] ou [4Fe-4S]	NO	N ₂ O	<i>E. coli</i> ; <i>D. vulgaris</i> ; <i>S. Typhimurium</i>
Cgb HbN	Hème	NO	NO ₃ ⁻	<i>C. jejuni</i> <i>M. tuberculosis</i>
YtfE ; DnrN ; ScdA	Centre fer dinucléaire non hème	Clusters Fe-S endommagés	Clusters Fe-S réparés	<i>E. coli</i> ; <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>S. aureus</i>
NnrS	Non connu : hème ou cuivre	Potentiellement cluster Fe-S	Non connu	<i>V. cholerae</i>

En conclusion, les protéines jouant un rôle dans la résistance au stress NO sont phylogénétiquement répandues, et les mêmes mécanismes sont utilisés dans différentes espèces bactériennes, ce qui prouve l'importance de la capacité à détecter et détoxifier le NO pour la survie des bactéries.

Points clés

- Le NO est une **molécule radicalaire diatomique** possédant un électron célibataire, qui lui confère une **forte réactivité** avec de nombreuses espèces organiques et inorganiques.
- Il peut réagir avec le dioxygène et ses dérivés pour **former des RNS**. Le NO, ainsi que les RNS qui en dérivent, sont impliqués dans des réactions avec les métaux de transitions, les thiols, les noyaux aromatiques, les clusters Fe-S, les acides nucléiques ou encore les lipides.
- Le NO est impliqué dans de **nombreuses fonctions biologiques chez l'Homme** et son effet peut être **bénéfique ou délétère** selon la localisation et la concentration à laquelle il est synthétisé.
- La source majoritaire de NO dans l'organisme est l'enzyme **NO synthase**, qui présente trois isoformes : la **nNOS**, la **eNOS** et la **iNOS**.
- La **iNOS** est principalement induite en **conditions pathologiques** et engendre la synthèse d'une quantité importante de NO. Le rôle du NO est primordial dans la réponse immunitaire et en particulier dans la **lutte contre les infections bactériennes**.
- Les bactéries possèdent un ensemble de systèmes complexes et spécifiques de **réponse et de résistance au stress NO**, et notamment des **facteurs de transcription senseurs de NO** qui régulent l'expression de gènes codant des **systèmes enzymatiques de détoxification**.

Partie II : Les *Escherichia coli* pathogènes

I. Définitions et caractéristiques

Les bactéries *Escherichia coli* ont été observées pour la première fois dans des fèces de nourrissons en 1885 par l'allemand Theodore Escherich et ont été nommées en hommage à ce dernier en 1919 par Castellani et Chambert. Les *E. coli* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et sont des bacilles à coloration de Gram négative, oxydase négatifs et catalase positifs, aéro-anaérobies facultatifs et ils présentent une croissance optimale à 37°C (Grimont, 1987). Les *E. coli* représentent l'espèce prédominante de la flore aéro-anaérobie facultative du tube digestif des mammifères à sang chaud, tels que l'Homme et sont donc considérés comme des microorganismes commensaux. L'implantation d'*E. coli* dans le tractus gastro-intestinal intervient dès les premières heures après l'accouchement, notamment au niveau du côlon.

E. coli est une bactérie dite « versatile » car elle est capable de réaliser des échanges de gènes par transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles comme des bactériophages, des plasmides ou des transposons. Aussi, la perte ou l'acquisition de nouveaux gènes conduit à l'émergence de nouvelles souches, dont certaines se sont révélées pathogènes pour l'Homme (Frost et al., 2005; Leimbach et al., 2013).

II. Systèmes de classification

1. La phylogénie

De nombreux outils, permettant l'identification rapide et universelle d'isolats d'*E. coli* pathogènes et commensaux, ont été développés ces dernières années. Ces méthodes sont fréquemment utilisées afin de déterminer les origines phylogénétiques des souches dans un contexte épidémiologique. Deux principaux systèmes de classification phylogénétique sont utilisés :

La classification en phylogroupes, aussi appelée « méthode Clermont », était à l'origine fondée sur une PCR triplex pour la recherche de deux gènes (*chuA* et *yjaA*) et d'un fragment d'ADN (TspE4.C2), et classait les *E. coli* en 4 phylogroupes A, B1, B2 et D (Clermont et al., 2000). Cependant, le développement des méthodes d'analyse de la phylogénie a montré que les *E. coli* comportaient plus de 4 phylogroupes. Ainsi, la recherche du gène *arpA* a été ajoutée, ainsi

que deux PCR allèle-spécifiques (pour les phylogroupes C et E), ce qui a permis la délimitation de sept phylogroupes : A, B1, B2, C, D, E, F (Clermont et al., 2013).

La classification en ST (*sequence type*) repose sur le séquençage de *loci* multiples (*MultiLocus Sequence Typing*, MLST). Il existe actuellement trois bases de données MLST pour *E. coli*, qui sont basées sur trois combinaisons de gènes différentes (Tableau 3), avec un seul gène en commun, *icd*. La base de données *EcMLST* créée par Thomas Whittam et hébergée à l'Université d'État du Michigan (East Lansing, États-Unis) était initialement consacrée à un groupe restreint d'*E. coli* pathogènes intestinaux, appelé EPEC (Reid et al., 2000), alors que celle créée par Mark Achtman et hébergée à l'École Médicale de Warwick (Coventry, UK) (Wirth et al., 2006), actuellement la plus utilisée, et celle développée par Sylvain Brisse et Erick Denamur et hébergée à l'Institut Pasteur (Paris, France) (Jaureguy et al., 2008), n'ont jamais été centrées sur un groupe particulier d'*E. coli*. On peut noter que, bien que la MLST soit une méthode efficace pour le typage des *E. coli*, la connaissance du ST d'une souche ne fournit pas directement d'informations sur son affiliation au phylogroupe.

Tableau 3. Caractéristiques principales des trois bases de données MLST des *E. coli*, d'après (Clermont et al., 2015)

Localisation	Gènes recherchés	Nombres de ST	Nombres de souches
Université d'État du Michigan	aspC, clpX, fadD, icd, lysP, mdh, uidA	1081	3965
École Médicale Warwick	adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA	4499	7583
Institut Pasteur	dinB, pabB, polB, icd, putP, trpA, trpB, uidA	771	1311

2. Les pathovars

Les souches d'*E. coli* pathogènes peuvent être classées en deux groupes : les *E. coli* pathogènes intestinaux (IPEC) ou extra-intestinaux (ExPEC), en fonction du site d'infection (Kaper et al., 2004; Russo and Johnson, 2000). Chaque catégorie est divisée en plusieurs pathovars, définis comme des groupes de souches d'une même espèce avec un même profil de virulence sur la base des signes cliniques associés et des facteurs de virulence impliqués.

a) Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux - ExPEC

Les ExPEC sont généralement des souches commensales du tractus gastro-intestinal capables d'engendrer une pathologie lorsqu'elles se retrouvent dans d'autres organes chez l'Homme (Sarowska et al., 2019). Parmi les ExPEC, on retrouve :

Les ***E. coli* uropathogènes (UPEC)**, responsables de cystites et de pyélonéphrites aiguës. Ils possèdent une multitude de facteurs de virulence et de stratégies pour faciliter la croissance bactérienne et la persistance dans le tractus urinaire. Les UPEC expriment, d'une part, plusieurs types de *pili*, qui leur permettent d'adhérer aux cellules épithéliales puis de coloniser les tissus du tractus urinaires. D'autre part, ils possèdent des facteurs chélateurs de fer, les sidérophores, qui leur permettent de récupérer le fer stocké dans les tissus de l'hôte, selon leurs besoins. Ils sont également capables de synthétiser une multitude de toxines, dont l'hémolysine A et le facteur I de nécrose cytotoxique (CNF1), qui induisent des dommages tissulaires et facilitent ainsi la dissémination des bactéries, libèrent les nutriments de l'hôte et rendent les cellules immunitaires inefficaces. Les toxines produites ont également la capacité de moduler des voies de signalisation de l'hôte affectant différents processus, comme la réponse inflammatoire ou la survie des cellules hôtes (Croxen and Finlay, 2010; Wiles et al., 2008).

Les ***E. coli* associés aux septicémies (SEPEC)** sont la cause de bactériémies souvent consécutives à une infection urinaire ou respiratoire, en particulier chez les personnes immunodéprimées, et sont plutôt retrouvés en milieu hospitalier. Dans ce type d'infection, les bactéries sont présentes dans le sang et diffusent dans divers tissus. Les SEPEC relarguent des endotoxines provoquant ainsi un choc septique. Par ailleurs, les septicémies à *E. coli* ne touchent pas uniquement les humains, on les retrouve également en élevage aviaire ainsi que dans la filière ovine où ils constituent une cause majeure de mortalité chez les agneaux (Conceição et al., 2012; Otto et al., 2016).

Les ***E. coli* associés aux méningites néonatales (NMEC)** ont la capacité de survivre dans la circulation sanguine et de coloniser les méninges chez les enfants. Ils sont la cause la plus fréquente des méningites liées à une bactérie à Gram négative chez les nouveau-nés. La contamination a lieu par voie périnatale, c'est-à-dire par l'intermédiaire de la mère. Après la colonisation initiale, les NMEC traversent la barrière intestinale pour atteindre la circulation sanguine et ainsi rejoindre le système nerveux central. Ils sont notamment capables d'interagir avec les cellules (Selvaraj and Prasadarao, 2005), et disposent ainsi d'une niche de réplication avant d'être disséminés dans la circulation sanguine. Les principaux facteurs de virulence des NMEC sont l'antigène capsulaire K1 et la protéine Iss, qui protègent les bactéries de la phagocytose et favorisent donc leur propagation, et les gènes *ibeA*, *B*, *C* qui permettent l'invasion des cellules cibles. Ces pathogènes sont la cause d'inflammations, d'œdèmes et de dommages au niveau des neurones (Croxen and Finlay, 2010; Sarowska et al., 2019).

b) Les *E. coli* pathogènes intestinaux - IPEC

Un signe clinique commun à l'ensemble des IPEC est l'apparition de diarrhées, c'est pourquoi ces bactéries sont également retrouvées sous le terme de pathogènes intestinaux «diarrhogènes». Ceux-ci sont divisés en sept pathovars dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4, et détaillés par la suite.

Tableau 4. Caractéristiques des pathovars d'*E. coli* responsables de syndromes diarrhéiques chez l'Homme (IPEC), d'après (Croxen et al., 2013)

Pathovars	Signes cliniques	Procédés majeurs de pathogénicité
<i>E. coli</i> entéro-pathogènes (EPEC)	Diarrhée aqueuse	Adhésion (BFP) Lésions d'attachement et effacement A/E
<i>E. coli</i> entéro-invasifs (EIEC)	Diarrhée dysentérique	Invasion cellules épithéliales (T3SS)
<i>E. coli</i> entéro-toxinogènes (ETEC)	Diarrhée aqueuse	Adhésion (CFA) Synthèse entérotoxines LT et ST
<i>E. coli</i> entéro-aggrégatifs (EAEC)	Diarrhée persistante	Adhésion (AAF) Synthèse entéro- et cytotoxines
<i>E. coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	Diarrhée aqueuse	Adhésion (F1845)
<i>E. coli</i> adhérents invasifs (AIEC)	Diarrhée chronique	Invasion cellules épithéliales (<i>pili</i> de type I, LPF)
<i>E. coli</i> entéro-hémorragiques (EHEC)	Diarrhée aqueuse Diarrhée hémorragique SHU/PTT	Lésions A/E Synthèse shigatoxines

Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) constituent le premier pathovar à avoir été identifié lors d'une épidémie de diarrhées infantiles au Royaume-Uni en 1945 (Neter et al., 1955). Ils font partie d'une famille de pathogènes qui produisent des lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal. Ces lésions se caractérisent par un effacement des microvillosités intestinales et un remaniement de l'actine des entérocytes pour former un piédestal sous le site d'attachement des bactéries (Nataro and Kaper, 1998). L'apparition de ce phénotype est due à l'expression des gènes du *Locus* d'Effacement des Entérocytes (LEE), et en particulier le gène *eae* (*E. coli* attaching effacing) (Bugarel et al., 2011). Les EPEC comprennent deux sous-groupes, dits typiques et atypiques, qui se différencient par la présence du plasmide pEAF, codant le facteur d'adhésion Bfp (*Bundle forming pili*) spécifique des EPEC. La seconde étape de l'infection, après l'adhésion,

est l'injection de facteurs de virulence dans les cellules hôtes par le biais du système de sécrétion de type III (T3SS). C'est l'injection de ces effecteurs dans la cellule hôte qui va induire le réarrangement du cytosquelette et aboutir à la formation du piédestal mais également à la modulation du système immunitaire. Ces effecteurs contribuent également à l'apparition des symptômes, le principal étant une forte diarrhée, pouvant être accompagnée de fièvre et de vomissements chez les enfants de moins de 2 ans (Croxen et al., 2013; Nataro and Kaper, 1998). Ces pathogènes sont l'une des causes majeures de diarrhées dans les pays en voie de développement.

Les ***E. coli* entéroinvasifs (EIEC)** sont la cause de diarrhées sanglantes pouvant évoluer vers des syndromes dysentériques (émission fréquente de selles en faibles quantités, sanglantes et riches en mucus) (Kaper et al., 2004). Ces symptômes sont généralement accompagnés de crampes abdominales, de fortes fièvres et de vomissements. Il est généralement admis que les EIEC et *Shigella* forment un même pathovar car ils présentent des mécanismes de pathogénicité similaires. Les EIEC diffèrent des autres pathovars d'*E. coli* car ce sont des pathogènes intracellulaires qui ne possèdent ni flagelle, ni facteurs d'adhésion. Leur virulence est principalement liée à un plasmide codant un T3SS, requis pour l'invasion, la survie dans les cellules et l'apoptose des macrophages. Ces pathogènes traversent la muqueuse par transcytose au niveau des cellules M (*microfold cells*). Ils pénètrent ensuite dans les macrophages, entraînant leur mort. Elles peuvent également se multiplier dans les colonocytes, diffuser dans les cellules adjacentes par l'intermédiaire d'un bras d'actine et conduire à la lyse des cellules colonisées (Croxen et al., 2013; Croxen and Finlay, 2010; Nataro and Kaper, 1998).

Les ***E. coli* entérotoxigènes (ETEC)** sont la cause la plus fréquente des diarrhées infectieuses du voyageur (« tourista ») et peuvent être létaux chez les enfants de moins de 5 ans. La colonisation par les ETEC a lieu au niveau de l'intestin grêle où ils adhèrent à la muqueuse intestinale grâce à l'expression d'adhésines fimbriales appelées CFA (*colonization factor antigen*). Suite à la colonisation de la surface mucosale, les ETEC synthétisent deux types d'entérotoxines : les thermolabiles (LT) et les thermostables (ST). Ces deux entérotoxines peuvent agir seules ou en combinaison et sont la cause du syndrome diarrhéique observé (Croxen et al., 2013; Croxen and Finlay, 2010).

Les ***E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC)** sont considérés comme le second pathogène en cause dans les diarrhées du voyageur et sont responsables de diarrhées persistantes chez les enfants et des personnes atteintes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il a également été estimé que ces souches pourraient être à l'origine de retards de croissance chez les jeunes sujets. Les EAEC colonisent les muqueuses de l'intestin grêle et du gros intestin par des

mécanismes d'adhésion agrégative entraînant la formation de «micro-colonies» et présentant un phénotype particulier de type « briques empilées ». Ce phénomène a lieu grâce à des adhésines fimbriales AAF (*aggregative adhesine fimbriae*) codées par des gènes présents sur le plasmide de virulence pAA. Les dommages sur les muqueuses intestinales provoqués par les EAEC sont liés à la sécrétion de cytotoxines et d'entérotoxines, cependant toutes les souches ne sont pas capables de sécréter ces toxines (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004).

Les ***E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont responsables de diarrhées aqueuses chez les jeunes enfants (de 18 mois à 5 ans) et peuvent également être associés à des infections urinaires. Ils présentent un phénotype d'adhésion diffuse sur les cellules HEp-2 et HeLa (Kaper et al., 2004). Ce mécanisme est modulé par la liaison de l'adhésine fimbriale F1845, appartenant à la famille des adhésines Afa/Dr, avec un facteur DAF (*complement decay-accelerating factor*) présent à la surface des cellules épithéliales intestinales. Cette liaison induit l'agrégation de molécules DAF sous les bactéries adhérentes, ainsi qu'un remaniement du cytosquelette dont résulte la formation de dommages et en particulier l'élongation des microvillosités de la bordure en brosse (Croxen et al., 2013; Croxen and Finlay, 2010).

Les ***E. coli* adhérents invasifs (AIEC)** sont impliqués dans les pathologies nécrosantes du tractus gastro-intestinal humain telles que la maladie de Crohn. Les pathologies liées aux AIEC sont une cause majeure de morbidité, nécessitant des traitements à vie, et de mortalité infantile. Les AIEC sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales et de les envahir grâce à l'interaction entre leurs *pili* de type I et les protéines de surface membranaires CAECAM6. Ils sont également capables de traverser l'épithélium pour accéder à la *lamina propria*. Pour cela, ils expriment un LPF (*long polar fimbriae*) qui interagit avec les cellules M, suivi par la translocation des bactéries pour atteindre la *lamina propria*. Ils sont alors capables de coloniser les phagolysosomes dans les macrophages sans induire l'apoptose de ces derniers (Croxen et al., 2013; Nataro and Kaper, 1998). Cette réplication dans les macrophages résulte en la sécrétion de taux élevés du facteur TNF- α , qui pourrait contribuer à l'inflammation caractéristique de la maladie de Crohn (Chassaing et al., 2011; Darfeuille-Michaud, 2002).

Les ***E. coli* entérohémorragiques (EHEC)** sont responsables de troubles variés chez l'Homme, allant d'une diarrhée aqueuse bénigne à une diarrhée hémorragique pouvant évoluer vers des complications potentiellement létales, telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU), une complication rénale observée principalement chez les jeunes enfants, ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), une atteinte cérébrale qui touche notamment les personnes âgées. Les EHEC se caractérisent par la production des Shigatoxines (Stx). Ces toxines entraînent la mort des cellules cibles par arrêt de la synthèse protéique et

induisent ainsi des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les EHEC appartiennent donc au groupe plus large des *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) (AFSSA, 2010). Il est cependant important de noter que les souches de STEC ne sont pas toutes pathogènes pour l'Homme ; ainsi la dénomination EHEC est réservée aux STEC isolés chez l'Homme en situation pathologique (Levine et al., 1987).

Pour conclure sur la notion de pathovars, il est nécessaire de préciser que malgré l'utilisation courante de cette classification, la frontière entre les différents pathovars n'est pas si évidente, du fait de la versatilité d'*E. coli*. En effet, ces dernières années de nouveaux profils ont été identifiés et il est maintenant clair que le spectre des types d'*E. coli* pathogènes est continu plutôt qu'une liste rigide de groupes séparés. On peut citer notamment des souches « hybrides » (Karmali, 2017) telles que la souche responsable d'une épidémie de grande ampleur en Europe en 2011. Cette souche présente les caractéristiques typiques des EAEC ainsi que la capacité de produire des Stx, une caractéristique des STEC (Frank et al., 2011)(Scheutz et al., 2011). Un autre exemple concerne une souche isolée d'un cas de septicémie humaine en 2013, qui synthétise des Stx, tout en étant capable de rejoindre la circulation sanguine via des déterminants spécifiques des ExPEC (Soysal et al., 2016). Ainsi, la classification des *E. coli* pathogènes en pathovars comme définie ci-dessus ne peut pas être utilisée aussi strictement et nécessite d'être nuancée.

3. Les sérogroupes et sérotypes

Une autre système de classification est fondé sur la détermination des antigènes de surface (Nataro and Kaper, 1998). Cette classification prend en compte, les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Les antigènes O, de nature lipopolysaccharidique, sont situés sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Stenutz et al., 2006). Le flagelle est constitué d'une partie basale, d'un crochet et d'un assemblage hélicoïdal de flagelline qui porte les épitopes H. Le séroroupe des *E. coli* est défini avec les antigènes O, tandis qu'une combinaison spécifique d'un antigène O et d'un antigène H définit le sérotype. En 2015, 184 sérogroupes ont été identifiés chez *E. coli* (Iguchi et al., 2015). Certains *E. coli* ne synthétisent pas d'antigène H et sont considérés comme non mobile (NM ou H-). Il existe également des antigènes K capsulaires mais ils sont moins fréquemment utilisés pour la classification car non communs à tous les *E. coli*. Même si des sérotypes sont spécifiquement associés à des épidémies, ces antigènes ne définissent pas la pathogénicité, mais sont un critère de classification (Gyles, 2007).

4. Les séropathotypes

Un autre type de classification existe spécifiquement pour les EHEC ; il s'agit des séropathotypes (Karmali et al., 2003) (Tableau 5). Ce classement permet de différencier les souches d'EHEC selon leur fréquence d'implication dans des épidémies, l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines et la sévérité de la maladie déclenchée chez l'Homme, c'est-à-dire l'apparition ou non du SHU. Les séropathotypes A et B sont associés à des épidémies, contrairement à C, D qui ne le sont pas ou rarement. Le séropathotype A comprend les souches les plus virulentes et les plus fréquemment associées aux cas de SHU comme les souches de sérotype O157:H7. Les sérotypes appartenant au séropathotype B sont moins fréquemment associés à des cas de SHU. Généralement, les EHEC ne possédant pas le *locus* d'effacement des entérocytes LEE, codant un facteur de virulence majeur (*cf. Partie III.II.1. Le locus d'effacement des entérocytes – LEE*), et impliqués uniquement dans des cas sporadiques de SHU appartiennent au séropathotype C. Les souches du séropathotype D sont à l'origine de diarrhées qui n'évoluent pas vers un SHU. Enfin, le séropathotype E contient des souches qui n'ont jamais été associées à des pathologies humaines, ce sont donc des souches de STEC.

Tableau 5. Classification des EHEC en séropathotypes, selon (Karmali et al., 2003)

Séropathotype	Incidence relative	Implication dans des épidémies	Association avec SHU	Sérotypes
A	Haute	Commune	Oui	O157:H7 ; O157:NM
B	Modérée	Exceptionnelle	Oui	O26:H11 ; O103:H2 ; O111:NM ; O121:H19 ; O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21 ; O104:H21 ; O113:H21 ; autres
D	Faible	Rare	Non	Multiples
E	Non humain	/	/	Multiples

III. Les *E. coli* entérohémorragiques – EHEC

Cette partie est spécifiquement dédiée au pathovar *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et décrit les différents aspects de l'infection, en particulier les voies de contamination, la prévalence des infections chez l'homme ainsi que les symptômes cliniques associés ou encore les moyens de lutte existant.

1. Voies de contamination

a) Réservoirs

Les études épidémiologiques menées suite aux premiers cas d'infections à EHEC chez l'homme ont révélé une transmission du pathogène à travers l'ingestion d'aliments contaminés d'origine bovine. Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence la présence de STEC potentiellement pathogènes chez un grand nombre d'espèces animales de mammifères, d'oiseaux, de poissons ou encore d'insectes (Persad and Lejeune, 2014). Cependant, les bovins constituent le principal réservoir à l'origine d'infections chez l'homme puisque le portage et l'excrétion sont asymptomatiques chez ces mammifères et que nous consommons de nombreux aliments d'origine bovine tels que la viande ou les produits laitiers. Plus de 435 sérotypes de STEC ont été identifiés chez le bovin. Un certain nombre d'études se sont intéressées à la prévalence des STEC chez le bovin, mais les résultats diffèrent selon les troupeaux d'animaux ainsi que la méthode et le plan d'échantillonnage utilisés. La prévalence observée chez le bovin varie en effet de 2 à 71% (Gyles, 2007). En revanche, chez les veaux, la prévalence ne dépasse pas 9,9%. Ainsi, l'excrétion des STEC en filière bovine semble être liée à l'âge et au sevrage des animaux. Une saisonnalité a également été observée, avec une excrétion plus importante en été par rapport à l'hiver (Jenkins et al., 2002; Ogden et al., 2004). Par ailleurs, des études ont montré que le portage est réduit dans des conditions de pH plus faible et des concentrations plus élevées en acides gras à chaîne courte dans le tractus digestif. Or, les aliments modifient le pH ruminal et la concentration des acides gras à chaîne courte. Par exemple, la prévalence des STEC chez les bœufs nourris par du fourrage est généralement plus importante, à cause des concentrations en tannins et en acide phénolique élevées (Brown et al., 1997; Harmon et al., 1999).

En outre, la concentration des STEC dans les fèces des bovins dépend des individus. Une étude a montré que celle-ci pouvait varier de 10^2 à 10^5 CFU/g de fèces (Zhao et al., 1995). Les bovins qui excrètent des quantités importantes de STEC ($>10^4$ CFU/g fèces) sont qualifiés de super excréteurs (Williams et al., 2014). De nombreuses incertitudes persistent quant à ces supers excréteurs. Cependant, une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait la présence d'un biofilm au niveau de l'épithélium intestinal, qui contiendrait donc une densité importante de STEC, et induirait une excrétion très importante suite au décrochement de morceaux du biofilm (Munns et al., 2015). L'excrétion importante des STEC est considérée comme un facteur de risque élevé pour l'exposition et l'infection des Hommes à ces agents pathogènes (Omisakin et al., 2003).

b) Transmission

Quatre voies principales de transmission des EHEC ont été mises en évidence à la suite d'épidémies ou de cas d'infections sporadiques : 1) l'ingestion d'aliments contaminés, consommés crus ou insuffisamment cuits ; 2) la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade) ; 3) la transmission interhumaine ; et 4) le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement (Figure 9).

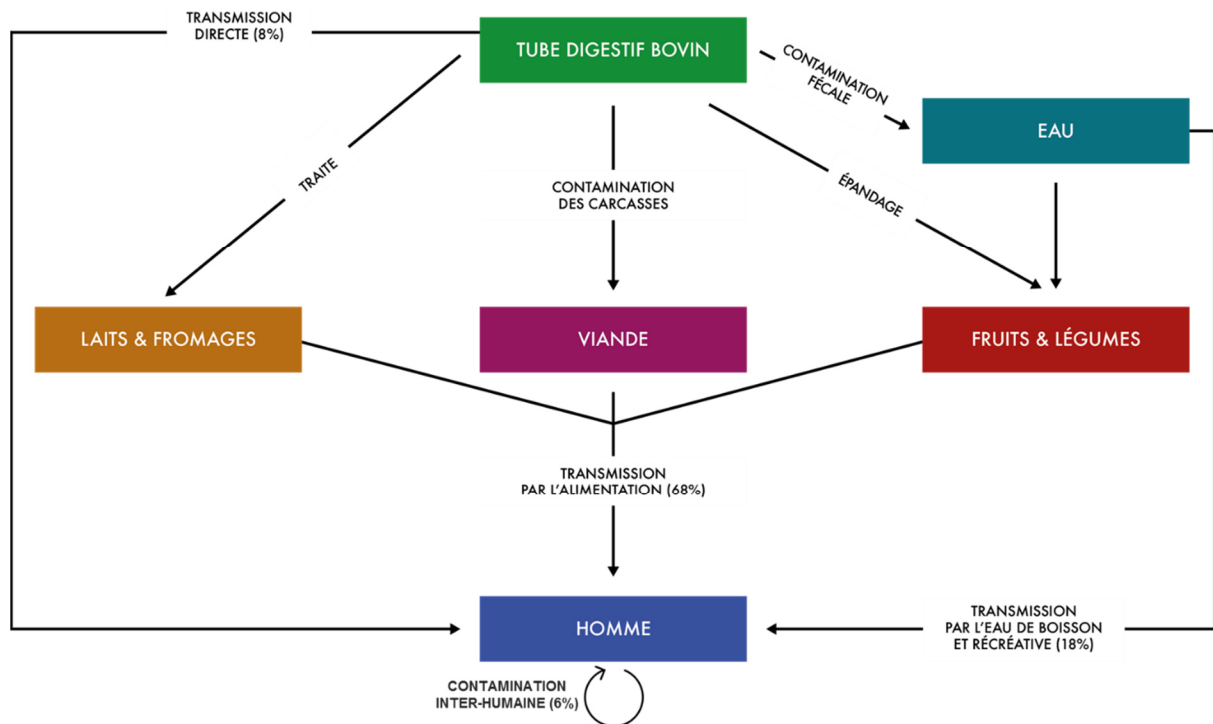


Figure 9. Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal, d'après (AFSSA, 2010)

La contamination alimentaire est impliquée dans plus de deux-tiers des infections à EHEC. Ce mode de transmission par l'alimentation conduit à la survenue d'épidémies d'envergure plus ou moins importante appelées toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (cf. *Partie II.III.3.b) Épidémies associées aux EHEC*). De nombreux produits sont mis en cause, dont principalement la viande de bœuf crue ou insuffisamment cuite, les produits au lait cru, ou les végétaux souillés par des déjections de ruminants excréteurs et consommés crus et mal lavés (ANSES, 2017; EFSA, 2015). On peut noter que les EHEC sont détruits à une température supérieure à 70°C. La contamination de produits carnés se fait généralement par l'introduction de carcasses d'animaux contaminées par des EHEC dans la chaîne alimentaire, notamment suite à des problèmes d'éviscération lors du processus d'abattage (Brugère et al., 2011). Le transfert des bactéries peut ensuite se faire par contact direct des aliments sur des

surfaces souillées lors des étapes de transformation des viandes. Concernant les produits laitiers, la contamination a lieu lors de la traite si les conditions d'hygiène ne sont pas respectées. La contamination des végétaux (fruits, salade, radis, épinards, oignons, graines germées,...) peut être due aux eaux d'irrigation des cultures ou au sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages.

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson contaminée ou à l'ingestion accidentelle d'eaux de baignade. Ces eaux seraient contaminées suite à des écoulements d'épandage dans les nappes phréatiques.

Les cas de transmission interhumaine résultent souvent d'une contamination oro-fécale. Les environnements à risques sont notamment les crèches, les centres de soins ou les hôpitaux. Mais ce mode de transmission est également à l'origine de la dissémination des pathogènes dans le cadre familial. Enfin, le fait que les animaux de bétail soient des porteurs sains favorise l'apparition de cas de contaminations chez les populations en contact direct avec les animaux de ferme.

2. Manifestations cliniques chez l'Homme

La dose infectieuse pour les EHEC est considérée comme faible, puisqu'elle a été estimée à moins de 50 bactéries ingérées (Nataro and Kaper, 1998). Les infections à EHEC sont caractérisées par différents symptômes, dont l'apparition se fait séquentiellement dans les 15 jours suivant l'ingestion des bactéries (Figure 10).

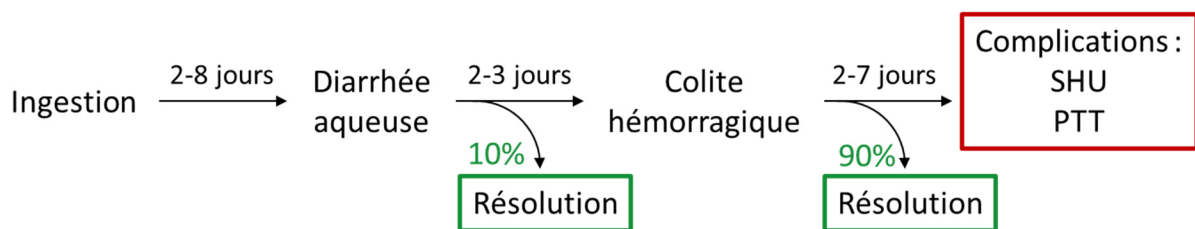


Figure 10. Évolution clinique des infections à EHEC, d'après (Tarr et al., 2005)

a) Les symptômes intestinaux

Après une période d'incubation de 2 à 8 jours, la première manifestation clinique d'une infection à EHEC est l'apparition de diarrhées aqueuses évoluant, dans 90% des cas, vers des diarrhées hémorragiques (Griffin and Tauxe, 1991). La diarrhée hémorragique dure généralement 2 à 7 jours, sans apparition de fièvre, malgré la présence d'une hyperleucocytose. Elle peut par contre être accompagnée de vomissements. Lors des

diarrhées hémorragiques, les lésions se localisent au niveau du cæcum et du côlon, et se présentent sous forme d'œdèmes, d'hémorragies et d'une nécrose de la muqueuse intestinale. Dans la majorité des cas, l'évolution est spontanément favorable en quelques jours, mais pour 10% d'entre eux, il y a apparition de complications telles que le SHU ou le PTT (Tarr et al., 2005).

b) Le syndrome hémolytique et urémique - SHU

Le lien entre les infections à EHEC et le SHU a été établi pour la première fois en 1983 (Karmali et al., 1983). Trois symptômes caractérisent cette pathologie : une anémie hémolytique (taux d'hémoglobine réduit), une thrombocytopénie (diminution des plaquettes) et une insuffisance rénale aiguë (Karmali et al., 2010; Tarr et al., 2005). Le SHU correspond à des lésions de microangiopathie thrombotique (MAT), touchant les reins et éventuellement d'autres viscères, caractérisées par un épaissement des parois des capillaires glomérulaires et/ou des artérioles, et la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les capillaires et les artérioles. Le SHU touche surtout les enfants de moins de 3 ans, mais également les personnes âgées, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Ce syndrome post-diarrhéique, appelé SHU typique, représente approximativement 95% des cas de SHU de l'enfant et constitue la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. D'autres organes tels que le pancréas, le foie et le système nerveux central peuvent également être touchés. Le taux de mortalité lié au SHU varie de 3 à 5% et plus d'un tiers des patients conservent des séquelles rénales à long terme (Noris and Remuzzi, 2005).

c) Le purpura thrombotique et thrombocytopénique - PTT

Le PTT est un dérivé du SHU et touche principalement les adultes, mais affecte surtout les personnes âgées. La relation entre ce syndrome et les infections à EHEC a été découverte en 1990 (Kovacs et al., 1990). Le PTT présente les mêmes caractéristiques physiopathologiques que le SHU mais diffère du SHU par le fait que les patients présentent de la fièvre et des symptômes neurologiques plus marqués. Le traitement actuel, qui est seulement symptomatique, permet de réduire la mortalité de 80%.

3. Prévalence des infections à EHEC et épidémies

a) Surveillance des infections à EHEC

La surveillance et le contrôle des infections à EHEC représentent un véritable enjeu pour les autorités de santé publique. Au départ, ce système était uniquement basé sur la détection des souches d'*E. coli* O157:H7, mais il a évolué puisque des souches de sérotypes non-O157 ont rapidement été identifiées comme étant responsables de cas sporadiques et d'épidémies

en Europe et aux États-Unis. En effet, on distingue à ce jour plus de 200 sérotypes impliqués dans l'apparition de symptômes chez l'Homme tels que la diarrhée hémorragique et le SHU (Loukiadis et al., 2012). Le Tableau 6 présente la répartition des sérotypes d'EHEC les plus fréquemment impliqués dans les cas de SHU pédiatriques entre 2011 et 2015, recensés par le système de surveillance français (ANSES, 2017).

Tableau 6. Répartition des sérotypes d'EHEC les plus fréquemment impliqués dans les cas de SHU pédiatriques en France entre 2011 et 2015 (ANSES, 2017)

	2011		2012		2013		2014		2015	
	Nbre cas	%	Nbre cas	%	Nbre cas	%	Nbre cas	%	Nbre cas	%
O157	56	34,6	50	34,5	48	31,6	37	31,6	19	17,1
O26	7	4,3	12	9	21	13,8	10	8,5	16	14,4
O80	0	0	6	4,1	10	6,6	10	8,5	15	13,5
O121	2	1,2	10	6,9	7	4,6	4	3,4	2	1,8
O103	5	3,1	0	0	1	0,7	2	1,7	2	1,8
O91	1	0,6	2	1,4	0	0	1	0,9	0	0
O145	5	3,1	5	3,4	0	0	2	1,7	3	2,7
O111	2	1,2	7	4,8	7	4,6	2	1,7	4	3,6
O104	4	2,5	0	0	3	2	0	0	1	0,9
O55	0	0	2	1,4	0	0	6	5,1	4	3,6

Chaque pays possède son propre système de surveillance basé sur un recensement volontaire ou une déclaration obligatoire des cas d'infections à EHEC ou de SHU (EFSA and ECDC, 2017; Ong et al., 2012). Aux États-Unis, c'est le programme FoodNet (*Foodborne Diseases Active Surveillance Network*), créé par le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), qui assure la 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 (*United States Department of Agriculture*) et la FDA (*Food and Drug Administration*). Le dernier rapport du réseau rapporte, pour l'année 2018, 440 cas d'infections liés à des souches de sérogroupe O157, et 662 cas dus à des souches non-O157, principalement O103, O26 et O111. Cela représente une incidence d'infection aux EHEC de 5,9 cas pour 100 000 habitants (Tack et al., 2019).

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*). Le dernier rapport de

ces organisations fait état de 6073 cas d'infections à EHEC en 2017 en Europe, soit une incidence de 1,66 cas pour 100 000 habitants, avec un taux de mortalité de 0,5%. Le sérotype le plus fréquent était O157 (31,9%) suivi par O26, O103 et O91. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la proportion d'infections liées à O157 diminue chaque année, alors que les sérotypes non-O157 augmentent (EFSA and ECDC, 2018).

En France, les infections à EHEC ne font pas partie des maladies à déclaration obligatoire et la recherche des bactéries dans les selles n'est donc pas réalisée en routine dans les laboratoires d'analyse médicale. Depuis 1996, la surveillance des infections à EHEC est basée sur le suivi des cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans. Ce système est géré par Santé Publique France, en collaboration avec 32 départements pédiatriques d'hôpitaux français. De 2007 à 2016, 116 cas de SHU pédiatriques ont été rapportés en moyenne chaque année, ce qui correspond à une incidence moyenne de 1 cas pour 100 000 enfants (Figure 11). Durant cette période, 1215 cas ont été notifiés, dont 32 (3%) ont été liés à 6 épisodes épidémiques, 4 d'origine alimentaire, et 2 liés à une contamination interhumaine dans des crèches (Bruyand et al., 2019).

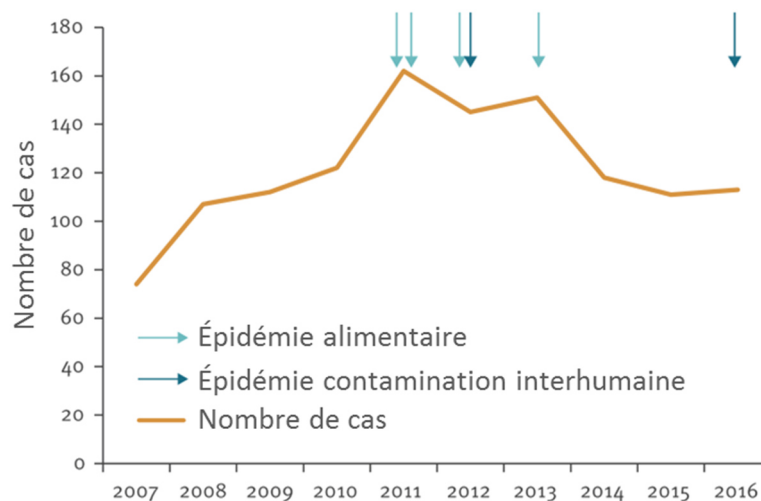


Figure 11. Nombre de cas de SHU pédiatriques et d'épidémies rapportés par le système de surveillance français entre 2007 et 2016 (n=1215 cas) (Bruyand et al., 2019)

b) Épidémies associées aux EHEC

➤ Les épidémies à l'échelle mondiale :

La distribution des EHEC est mondiale, mais les épidémies liées à ce pathogène ont surtout été rapportées dans les pays industrialisés. Cependant, les EHEC sont également présents dans des pays en voie de développement, comme l'Argentine, qui présente l'incidence de SHU liés

aux infections par les *E. coli* O157:H7 la plus élevée chez les enfants de moins de 5 ans (Rivero et al., 2010).

C'est aux États-Unis en 1982, qu'ont été identifiées les premières épidémies liées à des souches d'EHEC O157:H7, dans deux états distincts. Au total, 47 cas ont été recensés suite à la consommation de viande de bœuf hachée (Riley et al., 1983). En 1996, une épidémie causée par une souche O157:H7 a été à l'origine de 9451 cas d'infection et 12 décès à Sakai, au Japon. L'infection était liée à la consommation de germes de radis blancs contaminés et a touché plusieurs collectivités, comme des crèches et des maisons de retraite (Mermin and Griffin, 1999). La même année en Écosse 512 cas, dont 34 SHU et 17 décès ont été causés par la consommation de viande de bœuf et de produits à base d'œufs provenant d'une même boucherie et contaminés par *E. coli* O157:H7. Historiquement, cette épidémie reste la plus importante ayant eu lieu au Royaume-Uni (Cowden, 1997). En 2000, dans une ville située en zone d'élevage intensif de bœufs au Canada, une importante épidémie liée à une souche O157:H7 a engendré 2000 cas d'infection, 27 SHU et 7 décès. Les investigations épidémiologiques ont montré que les infections étaient liées à la consommation d'eau de distribution municipale contaminée (Anonymous, 2000). En 2011, une épidémie causée par une souche d'*E. coli* O104:H4 a été décrite en Allemagne (Frank et al., 2011). Celle-ci a été à l'origine de 3816 cas, 845 SHU et 54 décès. De plus, outre l'Allemagne, des cas de diarrhées hémorragiques et de SHU dus à cette souche d'*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 ont été identifiées comme la source de l'infection. Cette épidémie était inhabituelle puisque la majorité des personnes ayant développé un SHU était des adultes (89%). Par ailleurs, le séquençage du génome complet de la souche épidémique a montré qu'il s'agissait d'une EAEC ayant acquis un phage portant les gènes *stx* codant la Shiga toxine (Bielaszewska et al., 2011).

➤ **Les épidémies en France :**

La première toxi-infection alimentaire collective (TIAC) liée à *E. coli* O157 en France a été détectée en décembre 2000 et était due à des merguez insuffisamment cuites. La seconde a eu lieu en 2002 et était liée à des EHEC de sérotype O148:H8, présents dans de la viande de mouton provenant d'un élevage familial (AFSSA, 2003). Ensuite, deux épidémies majeures ont eu lieu en 2005. La première était due à des EHEC de sérotype O26:H11 et O80:H2 et liée à la consommation de camembert au lait cru. La seconde était due à des EHEC de sérotype O157:H7 présents dans de la viande hachée de bœuf surgelée. Elle a été la première épidémie à *E. coli* O157:H7 due à la consommation de steaks hachés de bœuf en France. Une autre

épidémie, également liée à la consommation de bœuf haché surgelé et à une souche O157:H7 a eu lieu en 2011 et a touché uniquement des enfants (King et al., 2014). En 2012, une première épidémie a été causée par la consommation de steaks hachés contaminés par O157:H7 et une deuxième a été liée à une transmission interhumaine d'EHEC du sérotype O111 dans une crèche (InVS, 2013). En 2013, une épidémie à EHEC O157, probablement due la consommation d'un fromage au lait cru, a été identifiée (King et al., 2013). Enfin, en mars 2019, la consommation de fromages Saint Marcellin et Saint Félicien contaminés par une souche O26 a été à l'origine d'une épidémie impliquant 1 adulte et 15 enfants dont 14 ont développé un SHU (Santé Publique France, 2019).

4. Moyens de lutte

L'enjeu majeur des infections à EHEC est qu'il n'existe pas actuellement de traitement thérapeutique universel. En particulier, l'antibiothérapie s'est parfois révélée problématique en aggravant le pronostic des patients traités (Smith et al., 2012). Il a en effet été montré que certains antibiotiques, notamment les quinolones, induisent le cycle lytique du phage portant les gènes *stx*, aboutissant à la surproduction et la libération massive de Stx (Melton-Celsa, 2014). Les traitements restent donc majoritairement symptomatiques et reposent notamment sur la prise en charge des complications liées au SHU. En particulier, la fonction rénale est assurée par des dialyses et des transfusions sanguines ou de plaquettes sont envisagées en cas d'anémie ou de thrombocytopénie (Goldwater and Bettelheim, 2012).

Certains traitements thérapeutiques ont cependant été testés ces dernières années avec des résultats encourageants, en particulier lors de l'épidémie européenne de 2011 (Bielaszewska et al., 2012). On peut citer par exemple le traitement à l'azithromycine qui n'engendre pas une surproduction des Stx *in vitro* et *in vivo* (Bielaszewska et al., 2012; Zhang et al., 2009). De plus, le traitement à l'azithromycine a été associé à une diminution de la durée d'excrétion du pathogène chez les patients traités, limitant ainsi le risque de transmission (Nitschke et al., 2012). Certaines souches d'EHEC présentent cependant une résistance plasmidique à cet antibiotique (Jost et al., 2016). Il est donc nécessaire de réaliser un test de concentration minimale inhibitrice sur la souche infectieuse préalablement au traitement pour vérifier l'absence de résistance. Une autre stratégie implique l'utilisation d'anticorps monoclonaux, comme Eculizumab (SOLIRIS®), qui sont dirigés contre la voie terminale d'activation du complément. Ce traitement s'est révélé efficace dans le traitement du SHU chez l'enfant (Lapeyraque et al., 2011).

En outre, des méthodes alternatives ou complémentaires sont actuellement à l'étude. L'une d'elles consiste à « inactiver » la Stx en utilisant de petits peptides capables de se fixer à la toxine, de bloquer son adhésion aux récepteurs Gb3 ou d'inhiber son transport

intracellulaire. Les ions Mg^{2+} , par exemple, inhibent le transport rétrograde des Stx vers l'appareil de Golgi et se sont montrés efficaces dans un modèle de souris intoxiquées par Stx1 (Mukhopadhyay and Linstedt, 2012). Par ailleurs, des approches thérapeutiques basées sur l'utilisation de probiotiques, ont également été envisagées (Cordonnier et al., 2016). Les probiotiques testés *in vitro* incluent principalement des bactéries lactiques et les levures du genre *Saccharomyces*. De nombreuses approches vaccinales font également l'objet d'études exploratoires grâce à l'utilisation de modèles animaux, notamment la souris et le porcelet (Bentancor et al., 2009; Sanchez-Villamil et al., 2019; Shojaei Jeshvaghani et al., 2019). Celles-ci reposent sur l'utilisation de vaccins composés de protéines recombinantes issues de différents facteurs de virulence comme l'intimine ou Stx, ou des vaccins à base d'ADN (Riquelme-Neira et al., 2016).

Points clés

- La dénomination STEC regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant les gènes *stx* codant la Shigatoxine ; la dénomination **EHEC concerne les STEC pathogènes pour l'homme**, c'est-à-dire isolés en situation pathologique.
- Les souches d'EHEC le plus souvent impliquées dans des épisodes épidémiques, dites «**EHEC typiques majeurs**», appartiennent aux sérogroupes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28 et O111:H8.
- Les principaux signes cliniques associés aux infections à EHEC sont **la diarrhée hémorragique, le SHU**, principalement chez les enfants, et **le PTT** chez les adultes.
- L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est inférieure à **1 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans, ce qui représente une centaine de cas par an**; elle est du même ordre de grandeur que celles observées dans d'autres pays européens.
- Parmi les animaux, **les bovins constituent le réservoir principal des EHEC** mais d'autres animaux, d'élevage ou sauvages, peuvent également être porteurs et ainsi participer à la contamination de l'environnement.
- Les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies d'infections à EHEC sont la **viande de bœuf hachée insuffisamment cuite, les produits laitiers non pasteurisés et les végétaux consommés crus**.

Partie III : Pathogénicité des EHEC

La survie et la virulence des EHEC dans le tractus gastro-intestinal sont des facteurs clés du processus infectieux. Durant le transit à travers le tractus digestif, les pathogènes font face à un certain nombre de facteurs de stress, comme le pH acide ou la présence d'acides biliaires, et à des conditions environnementales nécessitant une adaptation, comme la faible disponibilité en O₂. Les bactéries possèdent de multiples systèmes leur permettant de résister et de s'adapter à ces conditions, et elles peuvent ainsi atteindre les principaux sites de colonisation que sont l'iléon terminal et le côlon. L'adhésion des EHEC aux entérocytes fait suite à l'expression de gènes présents sur le *locus* d'effacement des entérocytes (LEE), et aboutit à la formation de lésions typiques d'effacement des microvillosités. Certaines souches, ne possédant pas le LEE, utilisent d'autres mécanismes pour l'adhésion. Les EHEC synthétisent ensuite les Shigatoxines (Stx), qui sont considérées comme le principal facteur de virulence des EHEC car elles contribuent à l'apparition des symptômes graves de la pathologie. Cependant la seule expression de *stx* ne semble pas être suffisante pour induire les symptômes liés à l'infection humaine (ANSES, 2017), ce qui suggère que d'autres déterminants de la virulence sont nécessaires pour déclencher la pathologie. Les EHEC sont également capables de résister à la nocivité de certaines molécules produites par le système immunitaire, comme le NO, qui a toutefois un impact sur les facteurs de virulence des EHEC.

I. Adaptation aux conditions environnementales du tractus digestif

1. pH acide

Suite à leur ingestion, les EHEC doivent traverser l'estomac. Le pH de l'estomac peut varier de pH 2, lorsque le sujet est à jeun à un pH proche de 7 lors de la prise des repas (Dressman et al., 1990). De façon générale, les conséquences d'une exposition à un pH acide chez les bactéries, sont des dommages membranaires, suivis d'une modification du pH cytoplasmique due à la pénétration d'ions H⁺, qui engendrent ensuite des dommages à l'ADN et aux enzymes et conduisent à la mort cellulaire (Rowbury, 1995). Ces effets néfastes justifient la nécessité pour les bactéries d'avoir des systèmes de défense, d'adaptation et des mécanismes de réparation pour faire face au stress acide.

S'il existe des variations de tolérance à l'acidité entre les souches (Large et al., 2005), les EHEC ont généralement une meilleure capacité à survivre dans des conditions de pH acide par rapport aux *E. coli* commensaux (King et al., 2010). Cette résistance à l'acidité contribue à la

faible dose infectieuse caractéristique des EHEC puisque même un faible nombre de bactéries est capable de franchir la barrière acide de l'estomac (Lin et al., 1996). Des études ont démontré que les souches O157:H7 ont une acido-résistance très élevée puisqu'elles peuvent survivre jusqu'à 3h dans un fluide gastrique synthétique à un pH de 1,5 (Roering et al., 1999) et leur résistance est accrue lorsqu'elles sont en phase de croissance stationnaire (Arnold and Kaspar, 1995). De plus, la réponse au stress acide peut être déclenchée avant l'ingestion, soit dans le tractus intestinal bovin, ou dans les aliments acides (Foster, 2004), et il a été démontré que dans ces conditions les EHEC sont mieux adaptés à survivre au stress acide lors du passage dans le tractus gastro-intestinal (Barnett Foster, 2013).

Les mécanismes de résistance à l'acidité des EHEC sont bien décrits (Benjamin and Datta, 1995) et font intervenir, d'une part, une modification structurale de l'enveloppe bactérienne, et d'autre part, la mise en place de systèmes enzymatiques consommateurs de protons intracellulaires. Concernant la structure membranaire, il a été montré que la composition des lipides membranaires d'une souche O157:H7 varie en fonction du pH, conduisant à une diminution de la fluidité membranaire à pH acide. Cette modification structurale limite l'entrée de protons dans le cytoplasme et contribue à une résistance accrue à l'acidité (Yuk and Marshall, 2004).

La résistance à l'acidité des EHEC repose également sur l'utilisation de plusieurs systèmes enzymatiques de réponse au stress acide, classés en 5 catégories nommées AR1 à AR5 (AR pour *acid resistance*), également utilisés par d'autres pathogènes entériques. AR1, est un système oxydatif, appelé aussi système réprimé par le glucose. Le mécanisme par lequel ce système confère la résistance à l'acidité à la bactérie est peu connu. Il a été décrit *in vitro* que ce système est activé chez les bactéries en phase stationnaire de croissance en milieu *Luria-Bertani* (LB) et réprimé après ajout de glucose dans le milieu. L'activation d'AR1 semble être régulée par la protéine CRP (*cAMP receptor protein*) et le facteur de réponse globale au stress RpoS (Castanie-Cornet et al., 1999; Price et al., 2000).

Les systèmes AR2 et AR3 sont des systèmes aminoacide décarboxylase et correspondent respectivement aux systèmes glutamate-dépendant et arginine-dépendant (Foster, 2004). Ces deux systèmes ont un mode d'action similaire (Figure 12). Les glutamate-décarboxylases GadA et GadB et l'arginine décarboxylase AdiA convertissent le glutamate ou l'arginine en acide γ -aminobutyrique (GABA) ou agmatine, respectivement, par une réaction de décarboxylation. Cette réaction consomme un proton recruté dans le cytoplasme bactérien et produit du CO₂. Le GABA et l'agmatine sont ensuite excrétés dans le milieu extérieur par les transporteurs spécifiques GadC et AdiC respectivement (Castanie-Cornet et al., 1999; Nguyen and Sperandio, 2012). La consommation des protons induit une augmentation du pH

intracellulaire et permet un maintien du pH, protégeant ainsi les composants cellulaires contre l'acidité. La régulation du système glutamate-dépendant est complexe et dépend des conditions environnementales (Foster, 2004). Par ailleurs, c'est ce système qui est privilégié dans des conditions de pH très faible (Castanie-Cornet et al., 1999).

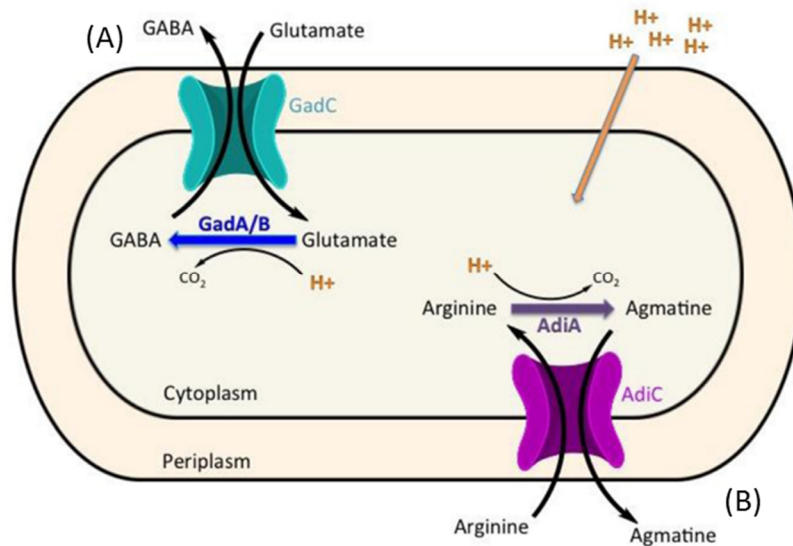


Figure 12. Représentation schématiques des systèmes AR2 (A) et AR3 (B) (Nguyen and Sperandio, 2012)

Gad = glutamate décarboxylase ; Adi = arginine décarboxylase ; GABA = acide γ -aminobutyrique

Les systèmes AR4 et AR5 font intervenir la lysine- et l'ornithine-décarboxylase respectivement, mais sont beaucoup moins efficaces que les précédents (Iyer et al., 2003). Ces systèmes sont placés sous le contrôle de régulateurs et permettent à la bactérie une régulation fine de sa réponse au stress acide.

Par ailleurs, les protéines chaperonnes HdeA et HdeB sont également impliquées dans l'adaptation aux conditions acides en protégeant les protéines périplasmiques, qui sont plus vulnérables à la dénaturation et aux dommages provoqués par un pH faible (Gajiwala and Burley, 2000).

2. Présence de sels biliaires

La bile est impliquée dans l'émulsification et la solubilisation des lipides et l'élimination des substances qui ne peuvent pas être excrétées dans les urines. C'est une sécrétion digestive produite par le foie, qui est riche en lipides et pauvre en protéines. Les composants majoritaires de la bile sont les acides biliaires, retrouvés dans le tractus digestif sous une forme conjuguée appelée sels biliaires et dont la concentration moyenne oscille entre 0,2 et 2 %. Ce

taux peut cependant varier davantage lors de la prise de repas (Gunn, 2000). Les sels biliaires, de par leurs propriétés amphiphiles, ont une action détergente, et ont donc un fort potentiel antimicrobien en engendrant des dommages aux membranes et à l'ADN et en induisant un stress oxydatif (Begley et al., 2005; Bernstein et al., 1999; Kandell and Bernstein, 1991).

L'adaptation des bactéries entériques à la présence de sels biliaires est donc un élément essentiel à leur survie dans le tractus digestif mais reste mal caractérisée à ce jour. Les mécanismes de résistance des *E. coli* semblent en effet communs à d'autres stress et sont basés sur la modification des structures membranaires afin de réduire la perméabilité aux sels biliaires ainsi que sur la mise en place de systèmes de pompe à efflux assurant le rejet des sels biliaires qui auraient traversé la membrane et atteint le cytoplasme (Begley et al., 2005)(Thanassi et al., 1997). La résistance aux sels biliaires peut être supérieure chez les EHEC. Par exemple, une étude en modèle bovin a démontré la capacité d'une souche O157:H7 à croître en présence de 15% de bile (Stoffregen et al., 2004). D'autres études ont rapporté l'isolement d'EHEC O157:H7 de la vésicule biliaire de veaux, où la souche est très persistante (Jeong et al., 2007; Reinstein et al., 2007).

3. Disponibilité en O₂

L'environnement intestinal est caractérisé par des niveaux variables d'O₂ avec une concentration qui diminue de l'estomac vers le côlon distal. Plusieurs facteurs sont susceptibles de contribuer à ce gradient, y compris l'apport d'O₂ lors de l'ingestion des aliments, la modification du flux sanguin et de l'oxygénation de la muqueuse intestinale en fonction de la digestion, et la consommation d'O₂ par les cellules de l'épithélium et le microbiote intestinal (Espey, 2013; Zheng et al., 2015). En plus de cette variation longitudinale, le long du tractus digestif, il existe également un gradient radial avec des concentrations croissantes d'oxygène de la lumière intestinale à la surface des muqueuses. Celui-ci se manifeste par des niveaux de bactéries commensales aéro-tolérantes plus élevés associées à la muqueuse intestinale humaine que dans les fèces (Albenberg et al., 2014).

Les *E. coli*, commensaux et pathogènes, sont anaérobies facultatifs et peuvent donc utiliser les respirations aérobie et anaérobie et la fermentation. En présence d'oxygène, *E. coli* utilise deux types d'oxydases : la cytochrome-oxydase *bo₃* de faible affinité, active en présence de fortes concentrations en O₂, et l'oxydase *bd*, de haute affinité, qui peut se lier à l'oxygène même à une concentration faible de l'ordre du nano-molaire ; cette dernière générant cependant moins d'énergie (Stolper et al., 2010). En conditions anaérobies, les *E. coli* peuvent utiliser plusieurs accepteurs finaux d'électrons tels que le nitrate, le nitrite, la triméthylamine N-oxyde (TMAO), le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le fumarate (Ingledew and Poole, 1984). En l'absence d'autres accepteurs d'électrons, *E. coli* peut effectuer une fermentation qui

engendre la formation de lactate, d'acétate, d'éthanol, de succinate, de formate, de dioxyde de carbone et d'hydrogène. Toutefois, ce processus n'est utilisé qu'en dernier recours, car il est le moins efficace sur le plan énergétique (Förster and Gescher, 2014).

II. Adhésion à l'épithélium intestinal

Après avoir transité dans les parties supérieures du tractus gastro-intestinal, les EHEC atteignent les sites de colonisation que sont l'iléon terminal et le côlon (Chong et al., 2007; Lewis et al., 2015; Phillips et al., 2000). Suite à une fixation initiale à la muqueuse, l'adhésion des EHEC est consolidée à travers l'expression de gènes localisés dans un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE).

1. Le locus d'effacement des entérocytes - LEE

Le LEE contient les gènes responsables de l'apparition des lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) caractérisées par un effacement des microvillosités et la formation d'un piédestal sous les bactéries, assurant une adhésion « intime » des bactéries à la surface des entérocytes (Figure 13) (Jerse et al., 1990; Wales et al., 2001).

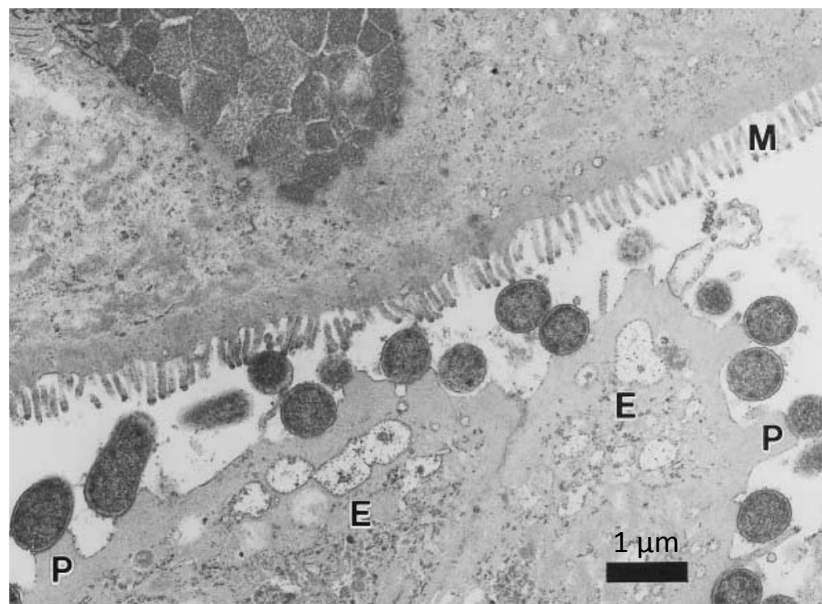


Figure 13. Lésions d'attachement et d'effacement induites par une souche d'EHEC O157:H7 sur des cellules épithéliales rectales de mouton (Wales et al., 2001)

Les bactéries adhèrent à la surface des entérocytes (E). Les microvillosités (M) sont effacées et on observe l'apparition de piédestal (P) sous certaines bactéries

Le LEE est un îlot de pathogénicité de 36,5 kb composé de 41 ORF, qui a été décrit pour la première fois chez les EPEC (Jarvis et al., 1995), et a depuis été caractérisé chez d'autres bactéries entéropathogènes. On peut noter que le LEE des EPEC et celui des EHEC présentent 93,9% d'identité au niveau nucléotidique, bien que celui des EHEC comporte 13 ORF supplémentaires à l'extrémité 5' dû à l'insertion d'un prophage cryptique (Perna et al., 1998). Ainsi, chez les EHEC, la taille du LEE est de 43 kb et il comporte 54 ORF. Le LEE est structuré en 5 opérons polycistroniques (LEE1 à LEE5) ainsi que des gènes formant des entités indépendantes. Cet ensemble de gènes code principalement un système de sécrétion de type III (T3SS) qui permet l'injection de protéines bactériennes appelées effecteurs directement dans le cytosol d'une cellule eucaryote (Büttner, 2012). Les autres gènes du LEE codent certains effecteurs ainsi que des protéines chaperones nécessaires à leur acheminement vers le T3SS, une adhésine appelée intimine, et des éléments régulateurs (McDaniel et al., 1995). L'organisation génétique du LEE d'une souche O157:H7 est présentée sur la Figure 14.

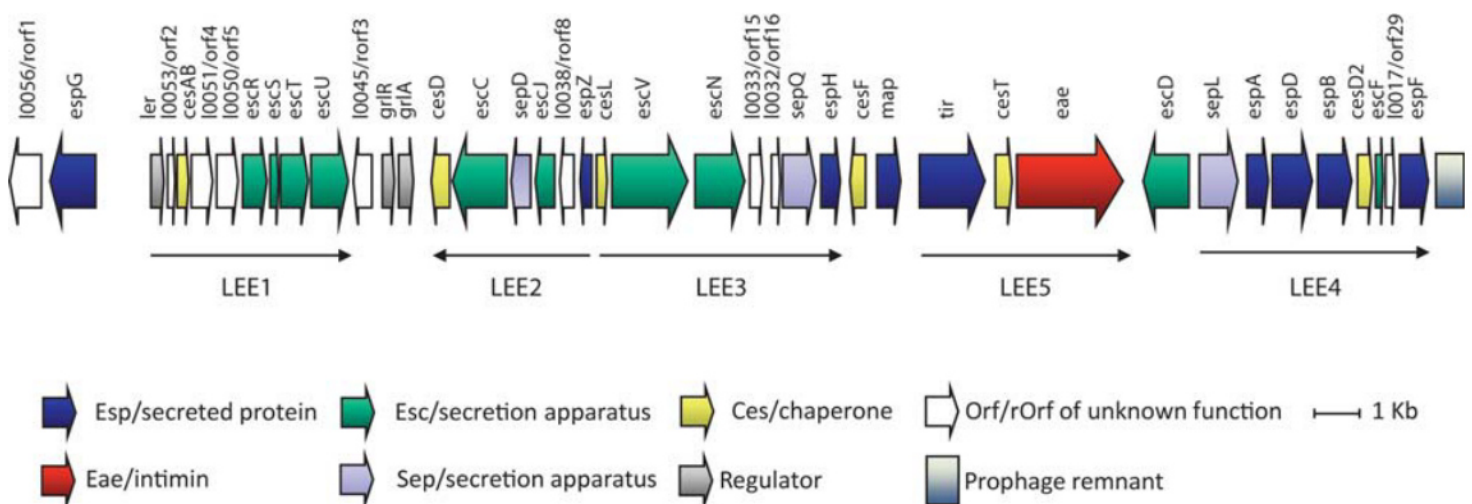


Figure 14. Organisation génétique du LEE d'une souche EHEC O157:H7 (Stevens and Frankel, 2014)

Les ORF sont représentés par les flèches épaisses, et les opérons polycistroniques par les flèches fines.

La régulation du LEE est très complexe puisqu'elle fait intervenir des régulateurs globaux et des régulateurs spécifiques dont certains sont codés par des gènes présents dans des prophages ou dans le LEE lui-même, et elle a lieu aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Mellies and Lorenzen, 2014). Le régulateur central du LEE est Ler (*LEE-encoded regulator*), un activateur transcriptionnel codé par le premier gène de l'opéron LEE1 (Elliott et al., 2000). Il a été démontré *in vitro* qu'une souche d'EHEC déletée de *ler* est incapable d'induire des lésions A/E sur des cellules Hep-2. Cette perte de fonction est associée à l'incapacité du mutant à exprimer les gènes du LEE nécessaire à la mise en place du système

de sécrétion de type III, démontrant le rôle majeur de Ler et du LEE dans le développement des lésions A/E (Elliott et al., 2000). Puisque Ler a un rôle central dans la régulation de gènes de virulence, cette protéine est considérée comme importante pour la pathogénicité des EHEC (Franzin and Sircili, 2015).

a) Le système de sécrétion de type III - T3SS

La structure complexe du T3SS correspond à une « seringue moléculaire », qui assure un pont entre la bactérie et la cellule hôte ciblée. Cette structure traverse à la fois les membranes internes et externes de la bactérie et la membrane plasmique de la cellule eucaryote à travers la formation d'un complexe de translocation ou translocon. La bactérie est alors capable d'injecter ses effecteurs directement dans la cellule cible via le T3SS. Ces effecteurs agissent ensuite sur les processus cellulaires eucaryotes à l'avantage du pathogène. Une représentation schématique de la structure du T3SS est présentée Figure 15.

La structure du T3SS est très conservée d'une souche à l'autre. Il comporte un anneau basal, enchâssé dans la membrane bactérienne interne, formé par les protéines EscD, EscQ, EscR, EscS, EscT, EscU et EscV (Esc pour *E. coli secretion*), avec à sa base les protéines SepD et SepL (Ogino et al., 2006). L'ATPase EscN est associée à cette base et permet d'apporter l'énergie nécessaire pour assurer la sécrétion des autres protéines de structure du T3SS et pour la sécrétion des protéines effectrices. La multimérisation de la protéine EscC permet la formation d'un pore dans la membrane bactérienne externe et EscJ, une protéine périplasmique, permet de faire la jonction entre l'anneau basal de la membrane interne et l'anneau formé par EscC dans la membrane externe (Crepin et al., 2005; Gaytán et al., 2016). EscF est ancré sur EscC et forme une seringue sur laquelle le complexe de translocation est assemblé. Celui-ci se présente sous la forme d'un large filament creux qui relie la bactérie à la cellule eucaryote et est constitué par la polymérisation de protéines EspA. Au niveau de la membrane de la cellule cible, un pore est formé par les protéines EspB et EspD (Delahay et al., 1999; Knutton et al., 1998). La structure ainsi formée permet d'effectuer le transfert d'effecteurs entre la bactérie et la cellule hôte.

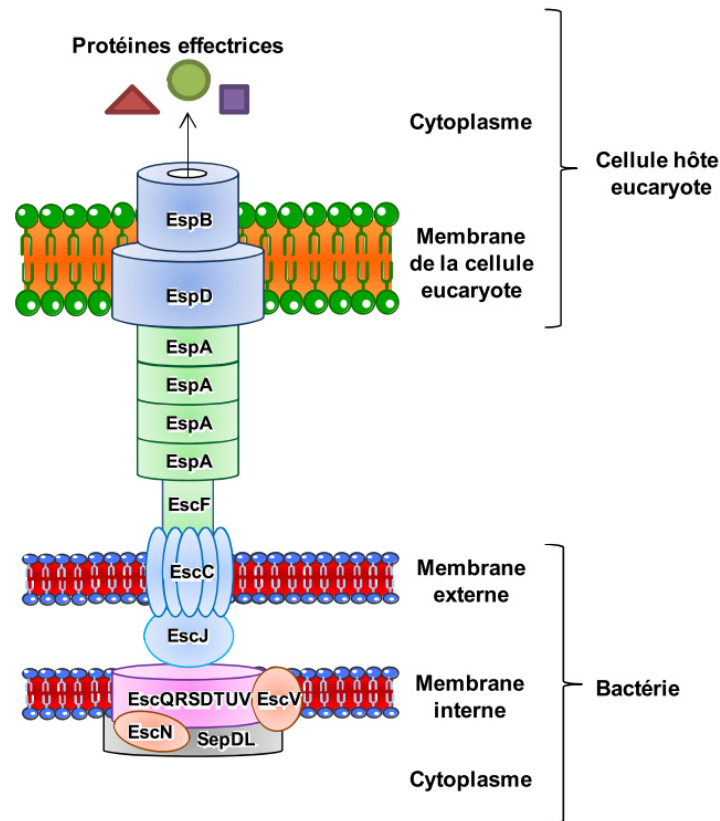


Figure 15. Représentation schématique du système de sécrétion de type III chez les EHEC, d'après (Tree et al., 2009)

b) L'intimine

L'opéron LEE5 contient le gène *eae* codant une adhésine, l'intimine Eae (*E. coli attaching and effacing*), et le gène *tir* codant pour Tir (*translocated intimin receptor*), le récepteur de l'intimine. Entre ces gènes *tir* et *eae* se trouve le gène *cesT* qui code une protéine chaperonne de la protéine Tir.

L'intimine est une adhésine membranaire de 94 à 97 kDa, qui permet l'adhésion intime des bactéries à l'épithélium intestinal. Il a été montré *in vivo*, chez le lapin, que des souches O157:H7 déletées du gène *eae* perdent la capacité de coloniser, de former des lésion A/E et d'induire les signes cliniques du SHU (Ritchie et al., 2003). À ce jour, 27 variants d'intimine ont été identifiés chez les *E. coli* pathogènes, en se basant sur l'hétérogénéité de l'extrémité 3' du gène *eae* (Ito et al., 2007; Xue-han et al., 2013). Les variants $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont les plus fréquemment retrouvés dans les souches d'EHEC isolées de bovins et de l'Homme (Aidar-Ugrinovich et al., 2007). L'intimine est composée de deux parties : la région N-terminale ancrée dans la membrane externe de la bactérie et la région C-terminale qui assure

l'interaction avec le récepteur Tir localisé à la surface des cellules épithéliales. En effet, Tir, une protéine de 78 kDa est injectée dans la cellule eucaryote par le T3SS. Elle s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et sert de récepteur pour l'intimine. Il existe 5 variants du gène *tir* (Bono et al., 2007).

L'interaction entre l'intimine et le récepteur Tir permet la mise en place d'une relation très rapprochée entre la bactérie et la cellule eucaryote cible. Tir interagit également avec les voies de signalisation de l'actine, induisant ainsi la formation d'un piédestal d'actine autour de la bactérie et l'effacement des microvillosités des cellules eucaryotes, caractéristique des lésions A/E (Figure 13) (Gaytán et al., 2016).

c) *Effecteurs bactériens injectés via le T3SS*

En plus de la protéine Tir, Le T3SS permet l'injection dans la cellule hôte de plusieurs autres effecteurs codés par des gènes du LEE, dont les mieux caractérisés sont présentés ci-après (Santos and Finlay, 2015).

La protéine **Map** cible les mitochondries des cellules épithéliales infectées. Map perturbe le potentiel de la membrane mitochondriale, provoquant ainsi la libération du cytochrome c, et déclenche alors l'apoptose intrinsèque. Cette protéine est également associée à l'apparition de modifications morphologiques des mitochondries. De plus, une étude en modèle murin avec le pathogène *Citrobacter rodentium* a montré que Map est impliqué dans l'altération de la barrière épithéliale intestinale (Ma et al., 2006; Santos and Finlay, 2015).

EspF est une protéine riche en région proline. C'est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle dans l'altération de la barrière épithéliale intestinale. Comme Map, EspF cible les mitochondries de la cellule hôte et clive les caspases 9 et 3 (Nougayrède et al., 2007), entraînant ainsi une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cela indique qu'EspF joue un rôle dans l'apoptose. De plus, des études utilisant des cultures d'organes intestinaux humains ont montré qu'EspF joue un rôle direct dans le remodelage de la bordure en brosse (Tahoun et al., 2011).

EspH est localisée dans la membrane de la cellule hôte. Cet effecteur empêche la phagocytose en inhibant les processus de réorganisation d'actine nécessaire à son fonctionnement. EspH serait également impliqué dans l'activation des caspases 3 et l'apoptose intrinsèque (Dong et al., 2010; Wong et al., 2012).

EspZ semble être impliqué dans la régulation de la translocation des effecteurs. EspZ est injecté dans les cellules hôtes dans les premiers stades de l'infection. Il inhibe la dépolarisation de la membrane des mitochondries et régule l'entrée des effecteurs dans la cellule hôte. En

effet, des mutants délétés du gène *espZ* sont moins cytotoxiques, probablement du fait de l'absence de régulation de la translocation des effecteurs (Berger et al., 2012; Roxas et al., 2012).

Par ailleurs, des études bioinformatiques et de protéomique, confirmées expérimentalement, ont révélé l'existence de plus de 30 protéines effectrices non codées par des gènes du LEE, sécrétées via le T3SS chez O157:H7. Cependant leurs fonctions sont pas ou peu connues à l'heure actuelle et des études supplémentaires seront donc nécessaires pour les caractériser (Stevens and Frankel, 2014)

2. Facteurs d'adhésion non codés par le LEE

Les EHEC produisent également de multiples adhésines fimbriales ou non fimbriales (McWilliams and Torres, 2014; Monteiro et al., 2016). Leur contribution aux processus infectieux des EHEC n'est cependant pas clairement établie même si certains d'entre eux pourraient contribuer aux étapes initiales d'adhésion avant la mise en place du T3SS.

D'une part, différentes adhésines fimbriales ont été décrites :

Les *fimbriae* de type I semblent importants pour la colonisation de l'épithélium intestinal et ont souvent été associés à la virulence de différentes souches d'*E. coli*. Cependant, leur rôle dans la pathogénicité des EHEC n'a jamais été démontré (Iida et al., 2001). De plus, ils sont très rarement exprimés par les souches de sérotype O157:H7 (Iida et al., 2001; Shaikh et al., 2007) car celles-ci qui contiennent une délétion de 16 paires de base dans la région régulatrice qui contrôle l'expression de ce type de *fimbriae*.

Les *fimbriae* Lpf (*long polar fimbriae*) sont connus pour adhérer à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine ou le collagène de type IV (Farfan et al., 2011). Ils contribuent ainsi à l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales, au niveau des cellules M. De plus, l'expression du Lpf a lieu au niveau de l'intestin grêle, mais pas du côlon, ce qui suggère une implication dans la colonisation lors des premières phases de l'infection (Cordonnier et al., 2017).

Le *pilus* de type IV HCP (*hemorrhagic coli pilus*) est impliqué dans l'adhésion des EHEC à de nombreux types cellulaires et dans l'invasion des cellules épithéliales, la formation de biofilms, l'hémagglutination des érythrocytes et la réponse pro-inflammatoire. Ces propriétés suggèrent qu'il contribue à la virulence, la survie et la transmission des EHEC mais également à l'inflammation observée dans les infections à EHEC (Xicohtencatl-Cortes et al., 2007, 2009).

Le **pilus ECP** (*E. coli common pilus*) et les **fimbriae F9, ELF** (*E. coli laminin-binding-fimbriae*) et **Sfp** (*sorbitol-fermenting fimbriae protein*) sont impliqués dans l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales *in vitro*, probablement à travers leur capacité d'interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire (McWilliams and Torres, 2014; Rendon et al., 2007). Il a également été montré qu'ECP et Sfp sont exprimés dans des conditions limitées en oxygène, ce qui correspond aux conditions environnementales du tube digestif (Low et al., 2006; McWilliams and Torres, 2014).

Par ailleurs, des structures fimbriales comme les *curli* et les flagelles ont également été identifiées comme des facteurs d'adhésion chez les EHEC.

Les **curli** interagissent spécifiquement avec des protéines de la matrice extracellulaire. Leur expression est induite par diverses conditions environnementales comme le pH, la température ou la carence nutritionnelle (Dong and Schellhorn, 2009). Les *curli* sont également impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilms par les EHEC sur les végétaux (Fink et al., 2012). De plus, dans certaines conditions, ils ont également un rôle dans la protection des pathogènes contre les antiseptiques chimiques, soit en formant une barrière physique autour des bactéries, soit en induisant la formation de biofilms (Carter et al., 2016; Ryu and Beuchat, 2005).

Les **flagelles**, associés dans un premier temps à la motilité bactérienne, ont également été identifiés comme facteurs d'adhésion aux cellules épithéliales humaines. Des données suggèrent que les flagelles interviennent dans les premières phases de l'adhésion, car leur expression est réduite après contact avec l'épithélium. De plus, les flagelles des EHEC sont capables d'interagir avec Muc2, une protéine du mucus recouvrant les cellules épithéliales intestinales (Erdem et al., 2007).

D'autre part, des adhésines non fimbriales ont été identifiées, la plupart appartenant à la famille des autotransporteurs.

EhaA et **EhaB** sont des autotransporteurs impliqués dans la formation de biofilms. EhaA est impliqué dans l'autoagrégation et EhaB dans l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène I et la laminine (Wells et al., 2008, 2009).

Saa (*STEC autoagglutination adhesin*) et **Sab** (*STEC autotransporter contributing to biofilm formation*) sont deux adhésines, qui ont été identifiées chez les EHEC atypiques (ne possédant pas le LEE) et sont impliquées dans l'adhésion aux cellules épithéliales humaines et dans la formation de biofilms. Elles contribuent à la colonisation des cellules de l'hôte par les EHEC

qui ne possèdent pas la capacité de former les lésions A/E (Herold et al., 2009; Paton et al., 2001).

Enfin, **Cah** (*calcium binding antigen 43 homologue*) est impliqué dans l'autoagrégation et dans la formation de biofilms. Cependant, son rôle dans la pathogénicité des EHEC reste à démontrer (Torres et al., 2002).

D'autres adhésines non fimbriales, potentiellement impliquées dans la colonisation et la pathogénèse des EHEC ont été identifiées. C'est le cas d'**Iha**, qui est présente dans les souches O157:H7 et absente des autres sérotypes. Cependant, son rôle dans la virulence n'a pas été démontré (Tarr et al., 2000). Par ailleurs, la protéine **OmpA** (*outer membrane protein A*), présente à la fois chez les souches *E. coli* pathogènes et commensales, semble être importante pour l'adhésion *in vitro* des souches O157:H7 aux cellules épithéliales humaines (Torres and Kaper, 2003).

III. Synthèse des Shigatoxines

Suite à l'adhésion, les EHEC synthétisent des Shigatoxines (Stx), considérées comme leur principal facteur de virulence. Ces toxines sont responsables de l'apparition des symptômes hémorragiques, du SHU et du PTT, puisqu'elles ciblent principalement les cellules endothéliales du côlon, des reins et du cerveau chez l'Homme. Elles sont synthétisées suite à l'expression des gène *stx*, présents dans le génome des bactériophages (ou phages) Stx (O'Brien et al., 1984; Schmidt, 2001; Smith et al., 1983).

1. Structure et variants de Stx

Les Stx sont des protéines de type AB₅, codées par un opéron de 1230 pb, constituées d'une sous-unité A et de 5 sous-unité B, formant ainsi un hétérohexamère. La sous-unité A, qui constitue le domaine catalytique, est composée de deux parties, la partie A1 qui contient le site actif et le peptide A2 relié d'une part à la sous-unité A1 par un pont disulfure, et d'autre part au pentamère de sous-unités B. Ce dernier constitue le domaine de liaison aux cellules humaines, et plus précisément au récepteur Gb₃ (globotriaosylcéramide). La structure tridimensionnelle de la Shigatoxine est présentée sur la Figure 16 (Gyles, 2007; Melton-Celsa, 2014).

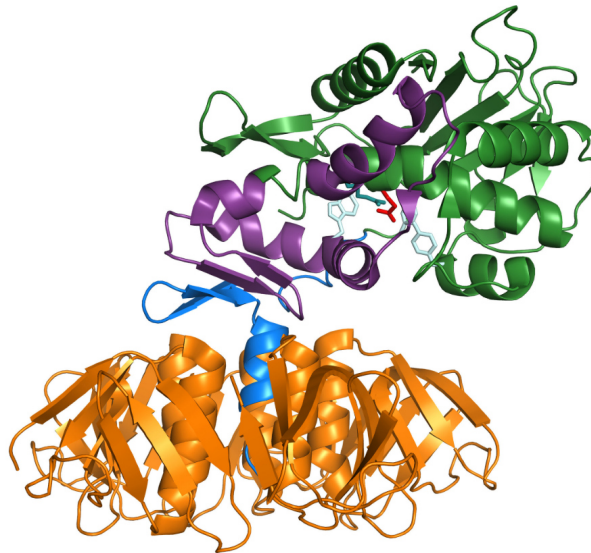


Figure 16. Structure tridimensionnelle de la Shigatoxine (Melton-Celsa, 2014)

La sous-unité B est représentée en orange ; le peptide A2 en bleu ; la majorité de la sous-unité A1 est en vert et le site d'interaction entre A1 et le ribosome (cible de Stx) en violet. Le site actif est représenté en bleu ciel et le résidu actif en rouge.

Toutes les Stx partagent les mêmes caractéristiques structurales et enzymatiques. Cependant, elles présentent des différences au niveau de leur séquence, leur activité biologique et leur réactivité sérologique. Les Stx chez *E. coli* sont classées en deux types majeurs : Stx1 et Stx2. Chaque groupe contient plusieurs sous-types, appelés variants, le groupe Stx2 étant plus hétérogène que le groupe Stx1. La nomenclature des variants Stx est basée sur la comparaison des séquences et a permis de mettre en évidence chez *E. coli* les variants Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f and Stx2g (Melton-Celsa, 2014; Scheutz et al., 2012). Stx2d, appelé aussi Stx2d activable, est particulier puisqu'il est sous divisé en Stx2d1 et Stx2d2. Chacun de ces variants possède un site de clivage par l'élastase présente dans le mucus intestinal. L'élastase clive la sous-unité A et rend ainsi les toxines actives (Kokai-Kun et al., 2000).

La méthode de typage de ces Stx, par PCR, est standardisée et utilisée pour la détection et la caractérisation des souches de STEC. Cette caractérisation a mis en évidence que chaque variant présente une épidémiologie différente. Une corrélation a été observée entre le type de Stx et la sévérité des symptômes. En effet, plusieurs études ont montré que certains variants Stx2 sont associés à un risque plus élevé de développer un SHU. Par exemple, Stx2a est associé à une forte virulence et à l'apparition de SHU, alors que les souches avec les variants Stx2e, Stx2f et Stx2g ont une faible pathogénicité chez l'Homme (Bielaszewska et al., 2006; Girardeau et al., 2005; Persson et al., 2007). Cependant, la variabilité des séquences codant les différents variants Stx a un impact sur la détection des STEC. En effet, dans certaines

études épidémiologiques ou cliniques, pour lesquels la détection des STEC est basée sur une PCR ciblant uniquement certains variants Stx, la présence des STEC peut être sous-estimée. Par exemple, une étude aux Pays-Bas évaluant la présence de Stx2f, un variant généralement peu détecté, a révélé que même s'il était associé à des infections de gravité moyenne, il était présent à une fréquence plus élevée que celle attendue (Friesema et al., 2014).

Par ailleurs, des études ont mis en évidence un lien entre les variants Stx et des réservoirs spécifiques. Par exemple, Stx1c a fréquemment été détecté dans des souches isolées de fèces d'ovins (Brett et al., 2003), Stx2e a été retrouvé dans des souches responsables d'œdèmes chez le porc (Weinstein et al., 1988), et Stx2f dans des souches isolées de pigeons (Schmidt et al., 2000). De plus, certains variants pourraient affecter le taux d'excrétion des STEC chez les bovins et ainsi augmenter le risque de transmission à l'Homme (Matthews et al., 2013).

2. Mode d'action des Stx

a) Translocation à travers l'épithélium intestinal

Les Stx, initialement produites par les EHEC dans la lumière intestinale, atteignent les organes cibles via la circulation sanguine. Pour cela, elles doivent donc traverser l'épithélium intestinal. Le mécanisme par lequel elles franchissent cette barrière n'est pas encore clairement identifié, à cause du manque de modèles animaux appropriés pour étudier cet aspect des infections à EHEC. Il existe donc plusieurs hypothèses, présentées sur la Figure 17 (Schüller, 2011).

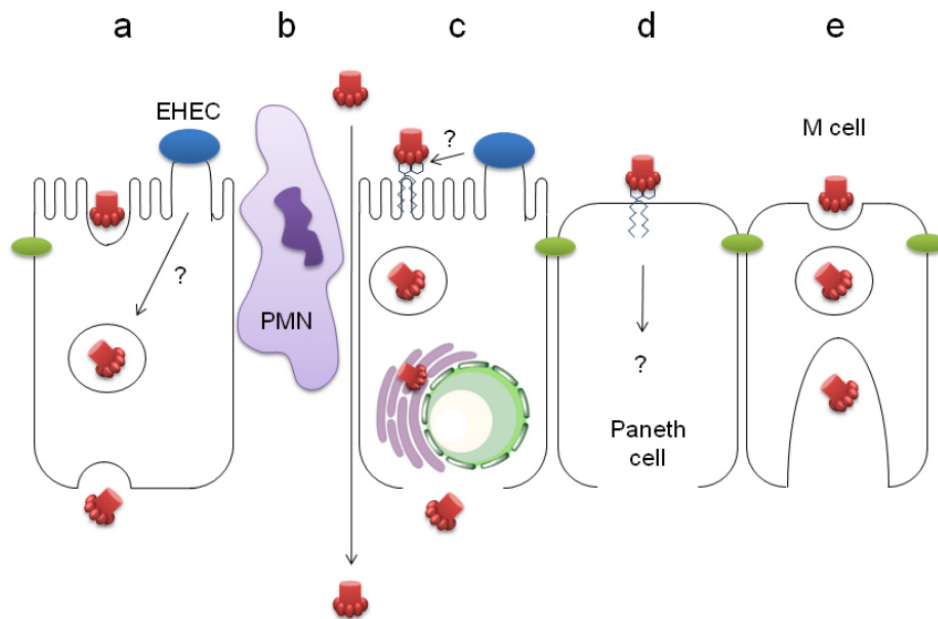


Figure 17. Voies potentielles de passage des toxines Stx à travers l'épithélium intestinal humain (Schüller, 2011)

(a) Transcytose Gb3-indépendante, probablement déclenchée par l'infection à EHEC ; (b) transport para-cellulaire lors du passage des polynucléaires neutrophiles ; (c) induction de l'expression de Gb3 par l'infection à EHEC, transport rétrograde et libération de Stx après la mort cellulaire ; (d) translocation Gb3-dépendante par l'intermédiaire des cellules de Paneth ; (e) transcytose via les cellules M. PMN : Polynucléaire Neutrophile.

Tout d'abord, un processus de transcytose au travers des cellules épithéliales pourrait permettre aux Stx d'atteindre la circulation sanguine. En effet, Stx1 et Stx2 sont capables de passer à travers des cellules T84 cultivés *in vitro*, sans affecter la viabilité cellulaire ou la fonction de barrière épithéliale. Dans le cas de Stx1, la toxine a été détectée dans des compartiments intracellulaires comme des endosomes, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique ou encore la membrane nucléaire. (Figure 17, modèle a) (Philpott et al., 1997). Une autre hypothèse repose sur la possibilité que les cellules épithéliales intestinales expriment le récepteur Gb3. Ainsi la toxine transiterait dans la cellule épithéliale selon le processus de transport rétrograde puis serait libérée dans la circulation sanguine suite à l'apoptose cellulaire induite (Figure 17, modèle c) (Schüller, 2011).

Ensuite, les Stx pourraient utiliser la voie para-cellulaire pour traverser l'épithélium intestinal (Figure 17, modèle b). En effet, les EHEC affectent la barrière intestinale, notamment en agissant sur les protéines des jonctions serrées, ce qui pourrait ouvrir une voie pour le passage des Stx entre les cellules. La migration transépithéliale des neutrophiles pourrait également entrer en jeu pour permettre cette translocation. Il est effectivement connu qu'une transmigration des neutrophiles a lieu lors des infections à EHEC, puisqu'un taux élevé de

neutrophiles est retrouvé dans les selles des patients infectés (Klein et al., 2002). Ce phénomène a été confirmé *in vitro* en co-incubant des cellules T84 avec des neutrophiles placés du côté basal, et en stimulant la transmigration des neutrophiles avec un agent chimioattractif appliqué du côté apical. La transmigration a provoqué une augmentation de la perméabilité membranaire d'une part, et une augmentation de la translocation de Stx1 et de Stx2 (du côté apical au côté basal) a été observée, à un taux proportionnel au niveau de transmigration des neutrophiles (Hurley et al., 2001).

Pour finir, la translocation des Stx pourrait se faire via les cellules M ou les cellules de Paneth. Ces dernières expriment le récepteur Gb3 à leur surface (Figure 17, modèle d), mais il a été montré dans des tissus prélevés de patients que toutes les cellules de Paneth n'expriment pas Gb3 (Schüller et al., 2007). Cependant, il n'a pas encore été déterminé si la liaison de Stx à Gb3 induit une cytotoxicité permettant la translocation de Stx ou si elle n'a aucun effet. Enfin, le passage des Stx, ou des EHEC eux-mêmes, pourrait se faire via les cellules M au niveau des plaques de Payer (Figure 17, modèle e). En effet, il a été montré qu'*E. coli* O157:H7 peut se lier aux cellules M via un fimbriae polaire (Cordonnier et al., 2017), conduisant à la translocation des bactéries à travers les cellules M. Une fois dans la *lamina propria*, les EHEC sont phagocytés par les macrophages dans lesquels ils survivent et produisent les Stx. L'accumulation de toxines induit ensuite la mort du macrophage hôte et les toxines sont libérées dans la circulation sanguine (Etienne-Mesmin et al., 2011). Il est également possible que les Stx se fixent sur les cellules M via des récepteurs non spécifiques, comme c'est le cas pour la toxine cholérique (Frey et al., 1996).

b) Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité

Une fois la barrière intestinale traversée, les Stx se retrouvent dans la circulation systémique et peuvent alors diffuser dans tout l'organisme et atteindre différents organes. L'action cytotoxique des Stx fait suite à la liaison spécifique entre la sous-unité B des Stx et le récepteur globotriaosylcéramide Gb3, également appelé CD77 (*cluster of differentiation*), présent à la surface des cellules cibles. Chez l'Homme, le principal organe cible des Stx est le rein. Dans les glomérules, unité de filtration du sang dans le rein, les récepteurs Gb3 sont présents sur les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les podocytes ; dans les régions extra-glomérulaires, Gb3 est exprimé par les cellules des tubules proximaux et des canaux collecteurs (te Loo et al., 2006; Van Setten et al., 1997). D'autres organes sont également ciblés par Stx ; Gb3 est notamment exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires dans le cerveau, ce qui explique les complications en lien avec le système nerveux central. Une étude en modèle murin a effectivement montré un effet de Stx sur les

neurones, qui expriment Gb3 puisque les souris, suite à l'injection de Stx, souffraient de paralysie des membres postérieurs (Obata et al., 2008).

La cytotoxicité des Stx dépend à la fois du nombre de récepteurs Gb3 à la surface des cellules cibles mais également de l'association de Gb3 à des radeaux lipidiques, qui sont des micro-domaines de la membrane plasmique, riches en cholestérol et en sphingolipides (Hanashima et al., 2008; Kovbasnjuk et al., 2001). Dans les cellules possédant des récepteurs Gb3 associés à des radeaux lipidiques, la liaison avec Stx provoque l'internalisation du complexe toxine-récepteur (Stx-Gb3) dans des endosomes qui atteignent ensuite l'appareil de Golgi (Figure 18). La sous-unité StxA est clivée par la furine, une protéase ancrée dans la membrane, ce qui génère une sous-unité A1 active et un fragment A2 (Garred et al., 1995). A ce stade, A1 et A2 sont encore liées par un pont disulfure. Le complexe Stx-Gb3 atteint ensuite le réticulum endoplasmique (RE) par un transport rétrograde (Warnier et al., 2006) et la sous-unité A1 est libérée par réduction de la liaison disulfure. Seule A1 quitte le RE pour rejoindre le cytoplasme (Sandvig et al., 1992, 2010). 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, et l'inhibition de la synthèse protéique. La réponse au stress ribotoxique mène ensuite à l'apoptose cellulaire (Schüller, 2011).

Par ailleurs, dans certains types cellulaires, comme les macrophages et les cellules dendritiques, les récepteurs Gb3 ne sont pas associés à des radeaux lipidiques ; le processus de transport des Stx est alors différent, et les cellules sont résistantes à l'activité cytotoxique de Stx (Figure 18). Suite à la liaison sur Gb3, la toxine est ciblée par la voie endosomale/lysosomale et est dégradée dans les lysosomes (Falguières et al., 2001). Par conséquent, la cytotoxicité de Stx semble liée à son transport rétrograde. Enfin, on peut noter qu'il existe un mécanisme similaire de résistance à la cytotoxicité des Stx dans les cellules épithéliales des cryptes intestinales chez le bovin, au moins pour Stx1 (Hoey et al., 2003).

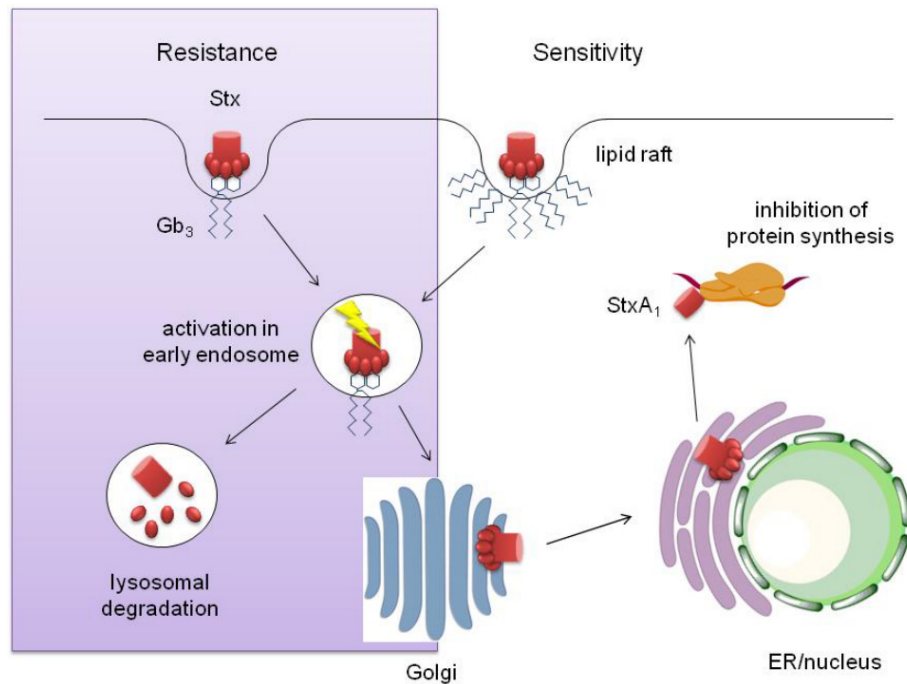


Figure 18. Voies de transport des Stx dans des cellules résistantes et sensibles (Schüller, 2011)

ER : réticulum endoplasmique

3. Régulation de la production des Stx

Les Stx1 et Stx2 sont codées par les gènes *stx1AB* et *stx2AB*, localisés dans le génome de deux phages distincts, intégrés dans le chromosome bactérien (prophages). Ces prophages, appelés phages stx, appartiennent à la famille des bactériophages λ (Tyler et al., 2004). Les phages stx sont des éléments génétiques mobiles et sont donc considérés comme des vecteurs des gènes *stx*. La transmission des phages stx peut avoir lieu au cours du transit intestinal mais également dans l'eau, les aliments, via les fèces ou encore les biofilms (Imamovic et al., 2009; Solheim et al., 2013).

La régulation des phages stx est similaire à celle des bactériophages λ : à l'état lysogénique, l'ADN du phage stx est intégré dans le chromosome bactérien et l'expression de *stx* est inhibée. En présence de divers agents inducteurs (Figure 19), le phage passe de l'état lysogénique à l'état lytique, étape appelée induction, et il y a alors expression de *stx*. Ainsi, l'expression de *stx* chez les EHEC dépend principalement de l'induction des prophages (Tyler et al., 2013; Wagner et al., 2001). Il a cependant été rapporté que la transcription de *stx1* peut également être induite par son propre promoteur dans des conditions de faible disponibilité en fer, et donc indépendamment de l'induction du phage (Aertsen et al., 2005; Calderwood and Mekalanos, 1987).

Comme les autres phages de type λ , l'induction du cycle lytique des phages stx est contrôlée par RecA, un régulateur de la réponse bactérienne SOS (Fuchs et al., 1999). L'activation de RecA est due à des agents ou conditions qui provoquent des dommages à l'ADN (Figure 19). La forme activée de RecA clive le répresseur de phage *ci*, ce qui conduit à l'induction du cycle lytique du phage. Parmi les agents induisant la réponse SOS, on peut citer les antibiotiques qui ciblent la réplication de l'ADN, comme les quinolones ou la mitomycine C (Zhang et al., 2000), ou encore H_2O_2 (Loś et al., 2010). Ensuite, la production de Stx est également corrélée à la perception de molécules signal associées à des régions spécifiques de l'intestin chez l'Homme et le bovin. Ainsi, le système kinase QseC (*quorum sensing E. coli*) régule l'expression de *stx* par le biais de la réponse SOS (Hughes et al., 2009). QseC répond aux molécules signal que sont l'adrénaline et noradrénaline ou l'auto-inducteur de type III (AI-3), une molécule de *quorum sensing* produite par les bactéries du microbiote intestinal, et induit la phosphorylation de QseF, qui induit l'activation de RecA (Reading et al., 2009). Enfin, l'éthanolamine, une substance retrouvée en quantité importante dans le tractus digestif peut également induire la production de Stx2 chez les EHEC. Ce mécanisme implique le régulateur d'utilisation de l'éthanolamine EutR, puisqu'une diminution de l'expression de *stx2* a été identifiée chez un mutant déleté d'*eutR* (Kendall et al., 2012). Enfin, il a également été montré qu'une carence en fer pouvait directement favoriser l'expression du gène *stx1*, via la protéine Fur (Waldor and Friedman, 2005).

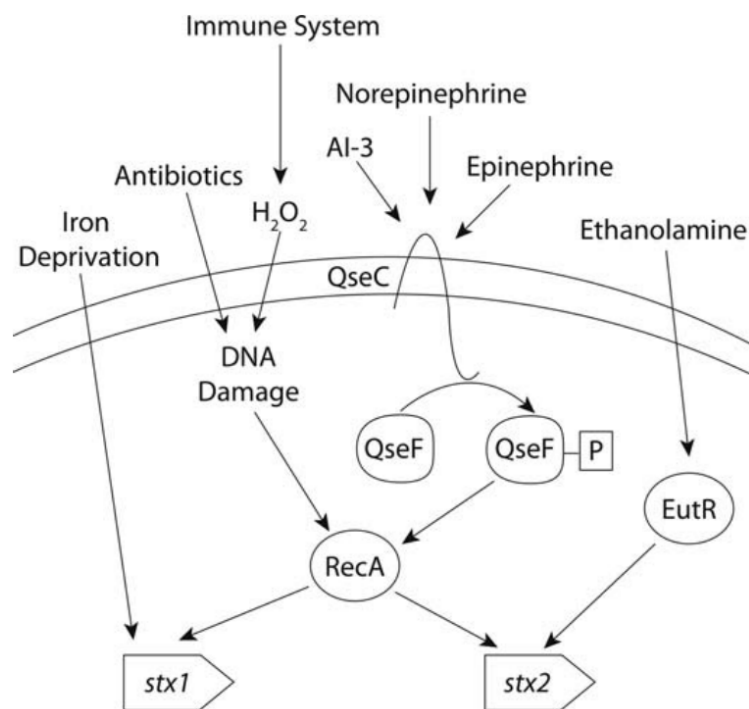


Figure 19. Induction de la production des Shigatoxines Stx1 et Stx2 (Mellies and Lorenzen, 2014)

Par ailleurs, la présence de prophages stx dans le chromosome bactérien a un effet direct sur l'expression de certains gènes bactériens. Notamment, l'expression des gènes impliqués dans la mobilité est augmentée lorsque les bactéries ont subi une infection lysogénique (Su et al., 2010). Les phages peuvent également réguler différentes étapes de l'interaction des EHEC avec l'épithélium intestinal. Par exemple, les phages stx induisent une augmentation de l'expression de la nucléoline, un des récepteurs de l'intimine, favorisant ainsi la colonisation intestinale (Robinson et al., 2006). En outre, une région régulatrice qui diminue l'expression du T3SS a été identifiée dans des phages stx, principalement retrouvés dans des souches O157 isolées de l'Homme (Tozzoli et al., 2014; Xu et al., 2012).

IV. Résistance à la réponse immunitaire de l'hôte : cas du NO

La présence des EHEC dans la lumière intestinale de l'intestin induit la mise en place chez l'hôte du système immunitaire inné et en particulier, comme décrit dans la *Partie I*, la production de NO via l'expression du gène iNOS dans divers types cellulaires. Le NO a un effet sur la synthèse de certains facteurs de virulence des EHEC et donc un potentiel effet protecteur pour l'hôte. Par ailleurs, les EHEC possèdent plusieurs mécanismes qui permettent de limiter l'impact négatif du NO.

1. Mécanismes de résistance au NO

En plus de l'ensemble des systèmes de détoxification du NO décrit chez *E. coli* (*cf. Partie I.IV. Adaptation des bactéries au stress NO*), les EHEC ont élaboré des mécanismes supplémentaires de résistance au NO, principalement en affectant la synthèse de NO par les cellules. D'une part, ils inhibent la voie JAK-2/STAT-1 des entérocytes, en augmentant la production de l'hème oxygénase HO-1 par les cellules épithéliales. HO-1 empêche l'activation de STAT-1, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'activation de la iNOS, malgré la présence de cytokines pro-inflammatoires. Par conséquent, les entérocytes infectés par des EHEC produisent peu de NO (Vareille et al., 2008). Le facteur bactérien responsable de cette inhibition n'a pas été identifié.

D'autre part, les EHEC inhibent l'inflammation induite via la voie NF- κ B, et donc indirectement la production de NO. Le facteur NF- κ B est un dimère formé à partir de 5 sous-unités potentielles différentes. Certains effecteurs bactériens du T3SS sont impliqués dans l'inhibition de la voie NF- κ B. Par exemple, NleH1 est une kinase qui se fixe sur la sous-unité RPS3 de NF- κ B et inhibe sa phosphorylation, empêchant ainsi la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc l'activation des gènes cibles (Gao et al., 2009; Wan et al., 2011). La protéine NleC est quant à elle une protéase qui clive la sous-unité p65, empêchant ainsi l'expression de l'activation des gènes par le complexe dimérique p50-p65 (Yen et al., 2010). Enfin, le rôle de

NleE dans l'inhibition de la voie NF- κ B est indépendant de l'inhibition par NleC, cependant son mode d'action n'a pas été identifié. De plus, il a été montré que les Stx pouvaient également moduler la voie NF- κ B dans des cellules n'exprimant pas le récepteur Gb3 (Gobert et al., 2007) et ainsi affecter la production de NO lors de l'infection.

2. Effet du NO sur les facteurs de virulence des EHEC

Malgré la capacité des EHEC à détoxifier le NO ou limiter sa production, ce dernier a un impact sur leurs facteurs de virulence majeurs. D'abord, une étude menée au laboratoire a montré que le NO endogène (produit par les cellules épithéliales) ou exogène (apporté par un donneur de NO dans le milieu) réprime l'expression du LEE chez les EHEC O157:H7 (Branchu et al., 2014). Par conséquent, le NO inhibe l'adhérence des EHEC aux cellules épithéliales intestinales humaines. En effet, le senseur de NO NsrR est un régulateur positif de ces opérons en interagissant directement avec le complexe ARN polymérase. En présence de NO, celui-ci se lie à NsrR et inhibe l'expression des gènes des opérons LEE1, LEE4 et LEE5. En parallèle, deux régulateurs impliqués dans la voie de résistance à l'acidité, GadE et GadX, sont induits par un mécanisme indirect dépendant du NO. Ainsi, comme présenté schématiquement sur la Figure 20, en absence de NO, NsrR active directement l'expression des gènes du LEE1/4/5 et inhibe indirectement l'expression de *gadE* et par conséquent de *gadX*. GadE active l'expression de *gadX* et agit comme un répresseur indirect des LEE4 et LEE5. GadX est un répresseur indirect de *gadE* et des gènes du LEE1. En revanche, en présence de NO, celui-ci se lie à NsrR et il n'y a plus d'activation des gènes des LEE1/4/5 par NsrR. En parallèle, l'expression de *gadE* est rétablie, ce qui induit une surexpression de *gadX*. Dans ce cas, GadE réprime fortement l'expression des gènes des LEE4/5 et GadX inhibe LEE1. Ainsi, en agissant sur la régulation des gènes du LEE via le régulateur NsrR, le NO démontre un potentiel pour limiter l'adhérence des EHEC à l'épithélium intestinal.

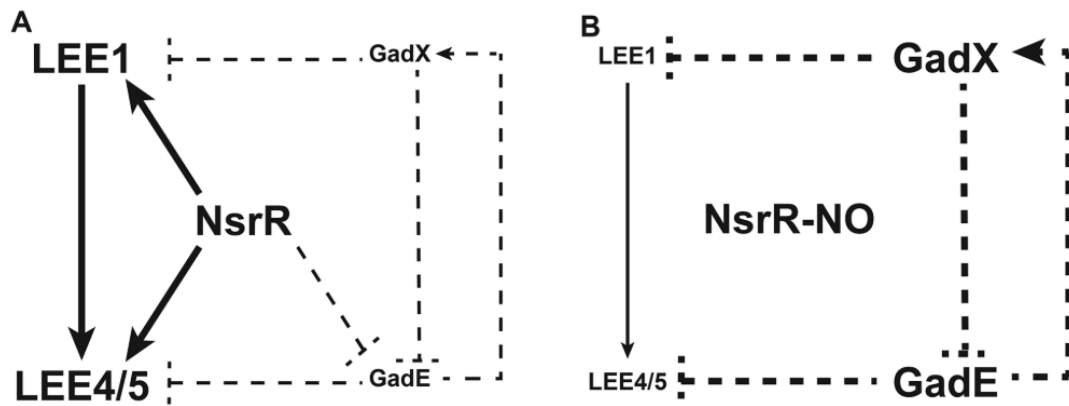


Figure 20. Modèle proposé pour la régulation des opérons LEE1/4/5 par le NO (Branchu et al., 2014)

Les lignes pleines indiquent une interaction physique entre le régulateur et le promoteur, démontrée par méthode ChIP, les pointillés indiquent un effet indirect.

Le NO a également une influence sur la production des Stx, mais les résultats sont contradictoires en fonction des études. D'abord, il a été montré *in vitro* que le NO, de source chimique ou cellulaire, inhibe l'expression, spontanée ou induite par la mitomycine C, de *stx2* et par conséquent inhibe la synthèse de Stx, sans pour autant altérer la viabilité des EHEC. Le mécanisme précis n'a pas été identifié mais l'hypothèse proposée est que le NO, via NsrR, favoriserait la transcription de facteurs qui empêcheraient l'activation de RecA ou diminueraient les dommages à l'ADN qui activent la réponse SOS et le cycle lytique du phage *stx* (Vareille et al., 2007). Cependant, une étude a récemment mis en évidence une augmentation de la production de Stx par les EHEC en présence de NO, sous la régulation de Fur et RecA (Ichimura et al., 2017). Cette étude *in vitro*, contrairement à la précédente, a été réalisée en conditions anaérobies, ce qui pourrait expliquer la différence de résultats. Par ailleurs, une étude *in vivo* a montré qu'une inhibition de la production de NO chez des souris intoxiquées par Stx induit une augmentation de la mortalité des animaux ainsi que des dommages rénaux plus importants (Dran et al., 2002). L'impact du NO sur la production des Stx semble variable et dépendant des conditions environnementales.

V. Autres déterminants de la virulence

1. Les plasmides

a) *pO157*

La plupart des souches EHEC O157:H7 possèdent un plasmide de virulence appelé pO157, dont la taille varie de 93 kb à 104 kb (Figure 21). Ce plasmide a également été retrouvé dans des souches O26:H11. Il comporte une centaine de gènes, parmi lesquels 35 sont potentiellement impliqués dans la virulence des EHEC, et seulement 19 ont été caractérisés. Parmi eux, on peut citer les gènes codant une hémolysine, des protéases ou encore un système de sécrétion (Lim et al., 2010; Makino et al., 1998).

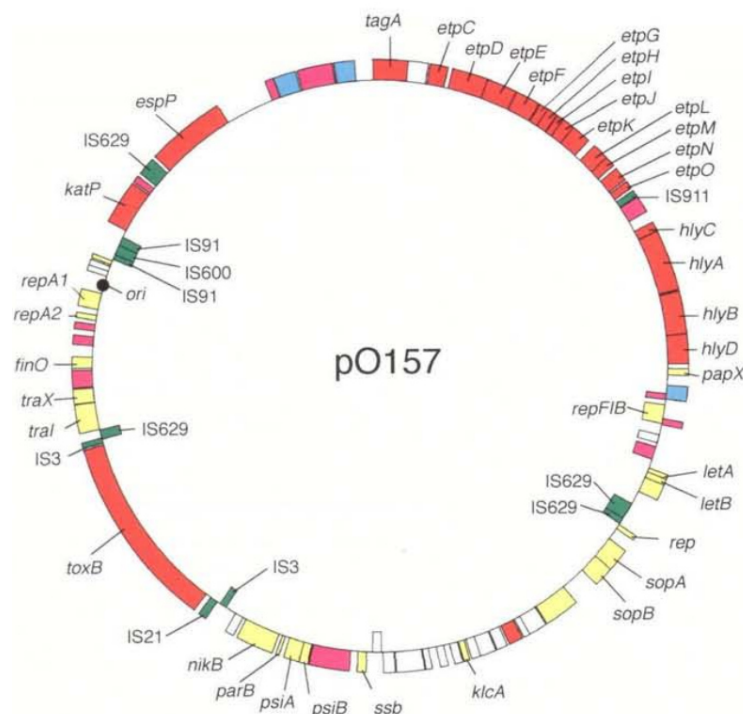


Figure 21. Représentation circulaire du plasmide pO157 d'une souche EHEC O157:H7 (Makino et al., 1998)

Les gènes portés par le plasmide pO157 ont été classés en six catégories : (1) les facteurs de virulence potentiels (rouge), (2) les facteurs de transfert et de maintien du plasmide (jaune), (3) les séquences d'insertion (vert), (4) autres fonctions (bleu), (5) gènes hypothétiques (violet) et (6) gènes sans fonction assignée (blanc).

Le gène *hlyA* code l'**hémolysine HlyA** qui appartient à la famille des toxines RTX (*repeats-in-toxin*) sécrétées par un appareil de sécrétion de type I et responsables de la formation de pores dans les membranes des érythrocytes et d'autres cellules eucaryotes cibles. Deux types de cette 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 et qui déclenche leur apoptose (Bielaszewska et al., 2014).

La catalase peroxydase KatP, codée par le gène *katP*, est localisée dans le cytoplasme et le périplasme bactérien et permet aux bactéries de résister au stress oxydatif. La protéine KatP dégrade le peroxyde d'hydrogène, et libère ainsi de l'oxygène. De cette façon, KatP semble favoriser la colonisation et la survie des EHEC dans le tube digestif, environnement pauvre en oxygène, en permettant d'utiliser ce dernier comme substrat dans la chaîne respiratoire (Lim et al., 2010; Uhlich, 2009).

L'autotransporteur EspP possède une activité sérine protéase, et semble impliqué dans la virulence des EHEC et particulièrement dans le développement de la diarrhée hémorragique et du SHU. En effet, EspP est capable de cliver, et ainsi réduire, l'activité de plusieurs facteurs de coagulation. Cela engendre des troubles de la coagulation qui peuvent faciliter le passage des Stx dans la circulation sanguine au niveau du site de colonisation de l'épithélium intestinal. EspP est également capable de cliver des protéines du complément, protégeant ainsi les pathogènes de l'opsonisation, processus biochimique destiné à favoriser la phagocytose (Orth et al., 2010). De plus, il a été montré que des monomères d'EspP peuvent s'assembler pour former un filament. Ce filament protège les bactéries contre les antibiotiques et les détergents, contribue à la formation de biofilms et présente des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales résultant d'un effet cytopathique (Dziva et al., 2007; Xicohtencatl-Cortes et al., 2010). Ainsi, EspP favoriserait l'adhésion et la colonisation des EHEC à l'épithélium intestinal et augmenterait la sévérité de l'infection.

La métalloprotéase StcE est sécrétée par l'appareil de sécrétion de type II. Il a été montré *in vitro* que StcE favorise l'adhésion intime des souches O157:H7 aux cellules épithéliales en clivant des glycoprotéines de surface comme la mucine. En effet, l'activité mucinase de StcE permettrait aux pathogènes de se rapprocher de l'épithélium intestinal et d'augmenter la disponibilité des nutriments (Grys et al., 2005).

L'adhésine potentielle ToxB, codée par le gène *toxB* de 9.5 kb, contribue à l'adhésion des souches O157:H7 en stimulant la synthèse et la sécrétion des protéines par le T3SS, telles que EspA, EspB et Tir, nécessaire à l'adhésion intime des bactéries aux entérocytes (Tatsuno et al., 2001).

Par ailleurs, on peut noter qu'il existe également des plasmides chez les STEC de sérotype non O157:H7. En 1992, la présence de plasmides de taille variable, porteurs du gène *ehxA*, a été mise en évidence chez des STEC d'origine bovine (Barrett et al., 1992). Ils ont ensuite été

détectés dans 18 à 30 % des STEC isolés chez les bovins. La comparaison des plasmides de haut poids moléculaire de STEC de divers sérotypes a permis de souligner une hétérogénéité dans leur composition. En effet, la recherche des gènes *espP*, *katP* et *hlyA* a donné toutes les combinaisons possibles ; certains plasmides ne portaient aucun des 3 gènes recherchés (Brunder et al., 1999).

b) *pS88*

Le plasmide pS88 ou plasmide ColV-Ia a été identifié pour la première fois dans la souche O45:K1:H7 S88, une souche d'ExPEC qui est une cause majeure de méningites et d'infections urinaire chez les jeunes enfants en France (Bidet et al., 2007). Cependant, un plasmide similaire à pS88 a été retrouvé en 2013 dans une souche d'EHEC de sérotype O80:H2 impliquée dans un cas de SHU combiné à une bactériémie chez l'Homme (Mariani-Kurkdjian et al., 2014).

La taille du pS88 des ExPEC est de 134 kb et il contient 144 gènes (Peigne et al., 2009) (Figure 22). Le plasmide pS88 contient des gènes codant deux bactériocines : la colicine V et la colicine Ia. Ensuite, il contient plusieurs régions potentiellement impliquées dans la virulence. D'abord, il comporte trois systèmes de captation du fer différents, à savoir l'aérobactine, codée par *iucABCD*, *iutA* et *shiF*, la salmocheline, codée par l'opéron *iroBCDEN* et les gènes *sitABCD*. Les autres facteurs de virulence potentiels portés par ce plasmide sont codés par le gène *iss*, impliqué dans la résistance au complément et qui favorise donc la survie des bactéries dans le sang ; les gènes *etsABC*, codant un système potentiel de sécrétion de type 1 ; *ompT*, codant une protéase externe de la membrane ; et *hlyF*, codant une hémolyse (Johnson et al., 2006; Lemaître et al., 2012; Peigne et al., 2009).

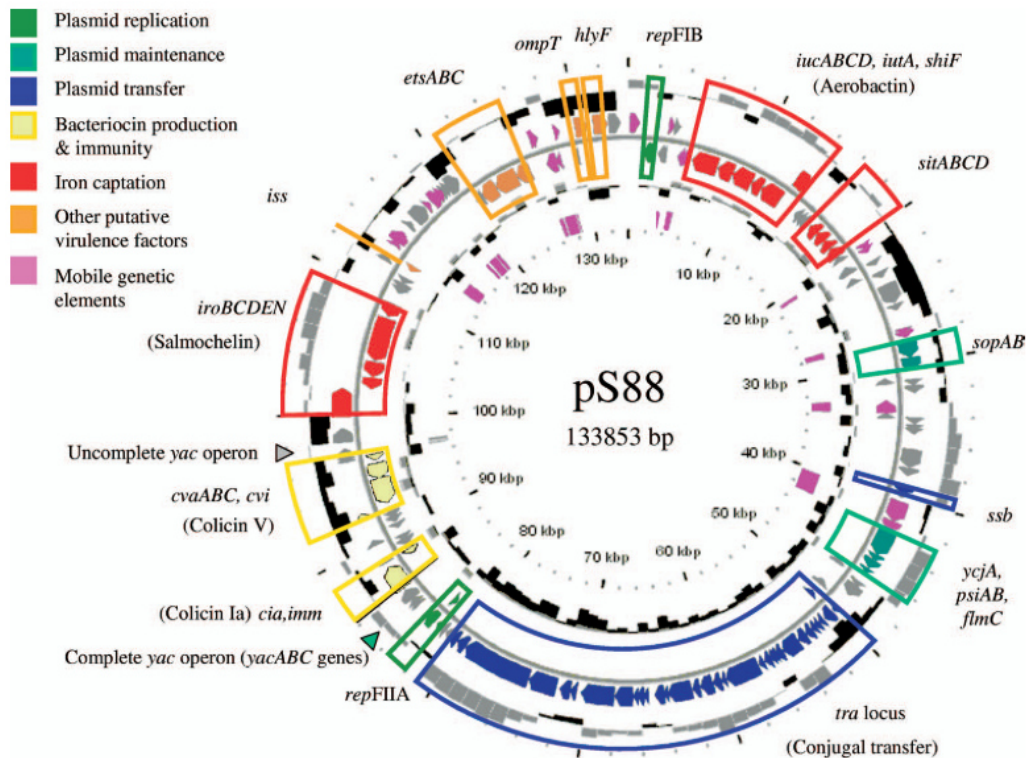


Figure 22. Représentation circulaire du plasmide pS88 de la souche d'*E. coli* S88 (Peigne et al., 2009)

Le plasmide similaire au pS88 retrouvé dans la souche O80:H2 contribue très probablement à sa virulence chez l'homme, en particulier pour établir la bactériémie. Ainsi, ce nouveau pathotype hybride représente une nouvelle menace aboutissant au développement d'un SHU ainsi que d'une bactériémie (Mariani-Kurkdjian et al., 2014).

2. Les îlots génomiques

Les îlots génomiques O, ou *O-island* (OI) correspondent à des régions présentes dans le génome des souches d'EHEC, dont O157:H7, et absentes du génome de la souche commensale de référence *E. coli* K12 MG1655. Au total, 177 OI ont été identifiés dans le génome de la souche d'EHEC de référence O157:H7 EDL933, dont certains contiennent des gènes de virulence (Perna et al., 2001). La distribution de ces OI semble être souche dépendante et un lien de causalité entre la présence de ces gènes et le déclenchement des pathologies a été établi (Coombes et al., 2008). Par ailleurs, certains effecteurs de la virulence, injectés par le T3SS dans la cellule hôte, et non codés par des gènes du LEE, appelés Nle pour *non LEE encoded effector*, sont retrouvés dans les OI (Tobe et al., 2006). A ce jour, 16 gènes *nle*, répartis sur 4 îlots de pathogénicité (OI-50, OI-57, OI-71 et OI-122) ont été identifiés. Leur principale fonction est la modulation de la réponse inflammatoire de la cellule hôte (Bugarel et al., 2011; Coombes et al., 2008; Delannoy et al., 2013; Ju et al., 2013; Karmali et al., 2003).

VI. Modèles d'étude *in vivo* de la virulence des EHEC

Des modèles animaux variés ont été développés pour l'étude *in vivo* de la pathogénie et des facteurs de virulence des EHEC (Jeong et al., 2018; Ritchie, 2014). Deux principales catégories de modèles existent : i) les modèles d'infection basés sur la contamination orale d'animaux par des souches d'EHEC afin d'analyser le processus infectieux dans son ensemble; ii) les modèles d'intoxication à Stx, le plus souvent par injection intraveineuse ou intrapéritonéale, afin d'étudier spécifiquement l'impact de la toxine sur le développement de la pathologie.

1. Modèles murins

a) Souris

➤ Modèles d'infection

En général, l'infection de souris conventionnelles par des pathogènes humains, dont les EHEC, ne permet pas d'observer une colonisation du tube digestif, ni l'apparition de symptômes. Ainsi, pour étudier la pathogénicité des EHEC, le premier modèle présenté consiste à infecter par voie orale des souris préalablement traitées avec un antibiotique (streptomycine ou mitomycine C). Ce traitement permet d'éliminer une partie du microbiote intestinal endogène des souris, plus particulièrement les anaérobies facultatifs, et assure ainsi une colonisation efficace du tractus digestif par la souche d'EHEC (Lindgren et al., 1993; Shimizu et al., 2003; Wadolkowski et al., 1990). Le traitement antibiotique permet par ailleurs d'estimer la capacité des EHEC à adhérer à la muqueuse intestinale en absence de compétition par le microbiote endogène. Ce modèle a l'avantage de présenter une bonne reproductibilité et un taux important de colonisation. Cependant, des variations importantes sur le développement de signes cliniques par les animaux infectés sont fréquemment observées entre les études, et probablement liées à des différences de conditions expérimentales, de souches d'EHEC et de lignées de souris. Un autre modèle d'infection développé est basé sur l'utilisation de souris axéniques. Ces souris ont notamment été utilisées pour étudier le rôle du facteur TNF- α dans les infections à O157:H7 (Eaton et al., 2008; Isogai et al., 1998). Les souris inoculées à la fois avec le facteur TNF- α et les EHEC, ont développé une maladie systémique, comprenant des dommages neuronaux, une inflammation du système nerveux central et des lésions rénales, plus précisément glomérulaires, y compris lorsque la dose infectieuse était faible (Isogai et al., 1998). Cependant, l'absence ou la réduction du microbiote intestinal endogène dans ces deux modèles ne permet pas de prendre en compte l'effet barrière du microbiote intestinal existant dans toutes infections du tractus digestif.

Par conséquent, d'autres modèles de souris avec un microbiote intestinal intact ont été développés (Mohawk et al., 2010; Tesh et al., 1993). Par exemple, des souris conventionnelles BALB/c femelles ont été inoculées oralement avec des doses élevées (10^9 CFU/souris ou plus) d'une souche O157:H7. Dans ce cas, les EHEC entrent en compétition avec le microbiote commensal grâce à leur concentration importante. Ce modèle a permis d'obtenir la colonisation des muqueuses intestinales par les EHEC, des dommages rénaux, la production de Stx et environ 30% de mortalité (Mohawk et al., 2010). De plus, il a pour avantage d'inclure la complexité de l'environnement microbiologique du tractus digestif et, en ce sens, se rapproche plus de la réalité des infections chez l'Homme. Cependant, la dose infectieuse très élevée constitue une différence majeure par rapport aux infections humaines.

Un autre modèle a été développé chez la souris afin d'utiliser des doses infectieuses plus proches de celle établie chez l'Homme (Tilden et al., 1996). Celui-ci est basé sur l'observation que certains enfants avaient eu une alimentation déséquilibrée avant d'être infectés. Ainsi, des souris de 5 semaines ont été soumises à un régime protéino-calorique (souris PMC pour *protein calorie malnourished*) puis infectées par une souche d'EHEC O157:H7 (Kurioka et al., 1998). Chez les souris PMC, la dose infectieuse était réduite par rapport aux souris contrôle. De plus, un sous-développement de l'épithélium intestinal a été observé, certainement lié à la malnutrition. Cette atteinte structurale favorise certainement la colonisation par les EHEC et peut-être également la translocation des Stx. Une augmentation de la translocation des Stx semble confirmée par un développement de dommages cérébraux importants associée à une détection de Stx dans l'hippocampe des souris malnutries. En revanche, ce modèle n'a pas permis d'obtenir des lésions rénales physiologiquement significatives (Kurioka et al., 1998).

En outre, un autre modèle d'infection chez la souris repose sur l'utilisation du pathogène intestinal murin *Citrobacter rodentium* (Bouladoux et al., 2017). Le processus infectieux de *C. rodentium* est similaire à celui des EPEC et des EHEC puisqu'il comporte un homologue du LEE et possède ainsi la capacité de provoquer des lésions A/E. Ainsi, ce pathogène a été utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des lésions A/E chez la souris, puisque c'est le seul pathogène LEE-positif connu pour un hôte différent de l'homme (Luperchio and Schauer, 2001). Par ailleurs, ce modèle permet aussi d'étudier la réponse inflammatoire intestinale dans le cas des colites, la cicatrisation des muqueuses, la réparation de l'épithélium, l'induction de la réponse immune mucosale et le rôle du microbiote intestinal dans la résistance à la colonisation par un pathogène entérique. La limite de ce modèle est qu'il ne permet pas un parallèle complet avec la physiopathologie des infections à EHEC car *C. rodentium* ne produit pas de Stx. Ainsi, une souche de *C. rodentium* portant le phage stx a été créée et utilisée en modèle murin. Les souris infectées par cette souche ont développé des

lésions A/E sur l'épithélium intestinal et des lésions inflammatoires intestinales causées par Stx. De plus, l'infection a été létale pour les souris, qui présentaient des lésions histopathologiques et fonctionnelles des reins à l'autopsie (Mallick et al., 2012). Ce modèle permet donc à la fois l'étude de la colonisation intestinale et l'effet de Stx, cependant, il n'inclue pas la différence de la réponse pathophysiologique entre les humains et les souris.

➤ **Modèles d'intoxication**

Ensuite, plusieurs modèles de souris reposent sur l'administration directe de Stx purifiées, par injections intraveineuse ou intrapéritonéale ou par voie orale, puisque Stx est considérée comme le principal facteur de virulence des EHEC. Ces modèles permettent donc d'observer les effets d'une intoxication à Stx sur les souris. L'injection de Stx1 ou Stx2 purifiées causent une paralysie, des dommages aux cellules épithéliales des tubules du cortex rénal et aboutissent à la mort des souris (Tesh et al., 1993). Cette première étude a cependant permis de mettre en évidence uniquement une fraction des symptômes liés au SHU. C'est pourquoi le modèle qui a ensuite été développé repose sur l'injection combinée des Stx et de LPS, une molécule très immunogène (Ikeda et al., 2004; Keepers et al., 2006; Psootka et al., 2009). L'exposition systémique aux Stx et au LPS a abouti à l'apparition des symptômes caractéristiques du SHU, tels que la neutrophilie, la thrombocytopenie, l'hémolyse des globules rouges et une augmentation du taux d'urée et de créatinine dans le sang (Keepers et al., 2006). Les dommages rénaux observés étaient dus à l'apoptose des cellules épithéliales corticales et médullaires exprimant Gb3 et ils étaient donc une conséquence de la fixation de Stx, provoquant une perte de la fonction des canaux collecteurs et donc une déshydratation (Psootka et al., 2009). Le rôle des LPS dans les modèles souris de SHU est cependant controversé. Il a été montré que la mortalité causée par l'injection combinée de Stx et LPS dépendait du moment auquel les LPS étaient injectés par rapport à l'intoxication avec Stx (Palermo et al., 2000). Au contraire, une autre étude n'a pas mis en évidence d'effet synergique de la co-administration des Stx et des LPS en se basant sur l'étude de l'induction des cytokines et la mortalité (Suzuki et al., 2000). Puis une étude plus récente a montré qu'une exposition répétée à des doses sublétales de Stx, en absence de LPS, engendrait le développement des symptômes du SHU (Sauter et al., 2008). Ce modèle semble plus se rapprocher de ce qui se passe chez l'Homme puisque l'exposition à Stx en cas d'infection est à priori plus longue que lors d'une injection unique.

Les Stx purifiées peuvent également être administrées aux souris par voie orale. En effet, l'hypothèse a été émise que *E. coli* O157:H7 libère Stx dans les aliments, ce qui aurait pour conséquences une intoxication sans infection (Rasooly and Do, 2010). Ainsi, cette hypothèse a été testée en modèle murin, en inoculant des Stx2 directement par voie orale. Ce modèle a

permis d'observer des dommages sur les reins, la rate et les tissus du thymus ainsi que la mort des souris (Rasooly et al., 2010). Ce résultat prouve par ailleurs que les Stx peuvent migrer hors du tractus digestif en absence des bactéries.

Pour finir, il existe des modèles «mixtes» dans lesquels la production de Stx suite à l'infection est fortement induite pour observer les effets de ce facteur de virulence. Par exemple, des souris préalablement traitées à la streptomycine, sont infectées oralement et reçoivent également une ou plusieurs injections intrapéritonéale de mitomycine C, de ciprofloxacine ou de fosfomycine (Fujii et al., 1994; Zhang et al., 2000). L'injection de ces antibiotiques induit l'expression des phages Stx et a donc pour conséquence l'augmentation de la production des Stx. Ce modèle permet d'induire le développement de symptômes neurologiques et/ou rénaux.

b) Rats

Un premier modèle chez le rat a été utilisé pour étudier le rôle du rat dans la dissémination des EHEC. Ainsi, des rats Wistar ont été infectés *per os* avec 10^5 ou 10^9 CFU d'EHEC O157. L'excrétion dans les fèces a été suivie chaque jour, puis les rats ont subi une seconde infection à 10^9 CFU, lorsque les bactéries n'étaient plus détectées dans les fèces. Enfin, lorsque les bactéries n'étaient de nouveau plus détectées, un stress a été appliqué en immobilisant les rats pendant 4 heures, afin d'induire et de mesurer une excrétion des bactéries. Dans ce modèle, les EHEC n'ont pas été capables de s'implanter de manière stable et durable dans le tractus digestif et il n'y a pas eu d'induction de symptômes cliniques chez les rats (Cizek et al., 2000). Un autre modèle repose sur l'injection intrapéritonéale de surnageants de cultures d'EHEC filtrés, contenant donc les Stx. Cette injection induit une diarrhée, des dommages rénaux, tels qu'une nécrose glomérulaire, une thrombose microvasculaire, une thrombocytopenie, une anémie hémolytique et une leucocytose, qui correspondent donc aux symptômes observés chez l'Homme (Zotta et al., 2008). Cependant dans ce modèle, la toxine n'est pas purifiée et il serait donc nécessaire de vérifier l'influence des autres facteurs solubles présents dans le surnageant. Pour finir, un autre modèle chez le rat repose sur l'injection intracérébroventriculaire, c'est-à-dire à l'intérieur d'un ventricule cérébrale, de Stx2, ce qui permet d'obtenir des dommages au niveau du système nerveux central, et plus précisément une mortalité neuronale et des dommages sur les cellules gliales (Boccoli et al., 2008; Tironi-Farinati et al., 2010).

2. Primates non-humains

Malgré les enjeux éthiques et financiers, les primates restent le modèle animal le plus adapté pour les recherches sur les maladies infectieuses car leur système immunitaire est très proche de celui de l'Homme. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées sur ce modèle pour étudier l'effet toxique des Stx. Des primates adultes *Macaca radiata* ont été infectés avec une souche O157:H7 et sacrifiés à intervalles réguliers durant 12 jours suivant l'infection pour étudier les dommages histologiques (Kang et al., 2001). Sur les 22 animaux de l'étude, 17 ont développé une diarrhée aqueuse, mais non sanglante, qui a duré au moins 4 jours suivant l'infection et la souche de l'infection a été isolée des fèces de ces 17 individus. Ensuite, des modifications de la muqueuse colique, telles qu'une vacuolisation ou l'extrusion des cellules épithéliales, ont été observées chez tous les animaux sacrifiés plus d'un jour après l'infection. Cependant, seule la moitié des animaux a développé des dommages rénaux, se limitant à une vasculopathie tubulaire légère.

Un autre modèle primate a été utilisé et repose sur l'injection intraveineuse de Stx (Taylor et al., 1999). Ce modèle a permis d'obtenir le développement d'une insuffisance rénale aigüe suivi de la mort des individus dans les 3 jours suivant l'infection. Les cellules épithéliales des tubules proximaux dans le rein et de la muqueuse intestinale, connues pour exprimer le récepteur Gb3, étaient sévèrement endommagées et des microthromboses ont été observées dans les glomérules rénaux. Des dommages cérébraux ont également été mis en évidence, et en particulier des œdèmes cérébraux légers à modérés et des œdèmes péri-vasculaires. Le même groupe a ensuite montré qu'avec une injection d'une dose de Stx1 (100 ng/kg) en intraveineuse, les animaux développaient les symptômes du SHU, y compris une insuffisance rénale aigüe, alors que l'injection de 4 doses de 25 ng/kg à 12h d'intervalle n'aboutissait à l'apparition d'aucun symptôme clinique ou histologique. Ce modèle a donc permis de montrer que le développement de la maladie dépend de la dose de Stx, comme cela est supposé chez l'Homme (Siegler et al., 2001). De plus, ils ont montré qu'une dose de 25 ng/kg de Stx2 engendrait l'apparition des symptômes du SHU, contrairement à la même dose de Stx1 (Siegler et al., 2003).

3. Autres animaux

Les bovins sont considérés comme le principal réservoir des EHEC, et donc responsables de la contamination humaine. Mais, puisque les bovins sont porteurs sains, les modèles développés chez ces animaux sont destinés à étudier la réduction de la colonisation (Dean-Nystrom et al., 2008; Hamm et al., 2016). Ainsi, il a été montré que les EHEC peuvent être détectés pendant plusieurs jours, non seulement dans les principaux sites de colonisation que

sont le côlon et le cæcum, mais aussi dans l'intestin grêle et la vésicule biliaire (Dean-Nystrom et al., 2008).

D'autres animaux comme les poulets, sont également considérés comme des réservoirs potentiels des EHEC. Une étude a cependant montré que les sites de colonisation majeurs dans ce modèle sont le côlon et le cæcum et que les EHEC sont capables de former des lésions A/E sur ces cellules, indiquant donc que ce modèle pourrait être utilisé pour l'étude de ce type de lésions (Sueyoshi and Nakazawa, 1994).

Ensuite, le porcelet a été utilisé comme modèle d'œdème porcin en injectant Stx2e en intraveineuse ou par administration orale d'EHEC produisant Stx2e (Oanh et al., 2012; Sato et al., 2017). De plus, un modèle porcin d'infection par EHEC a été utilisé pour valider un traitement aux anticorps monoclonaux contre Stx2 (Moxley et al., 2017).

Par ailleurs, suite à un cas d'insuffisance rénale liée à un SHU chez un chien rapporté dans les années 90, des modèles canins ont également été développés (Holloway et al., 1993; Raife et al., 2004). Une étude, chez des lévriers, a notamment montré que l'injection de Stx1 ou Stx2 induit le développement de diarrhée aqueuses et de symptômes du SHU, comme une thrombose microvasculaire (Raife et al., 2004).

Enfin, les lapins ont également été utilisés comme modèles puisque l'inoculation d'EHEC induit des lésions intestinales et rénales chez ces animaux. En effet, ces organes cibles expriment le récepteur à la toxine Gb3 (García et al., 2006). Des dommages rénaux et des diarrhées ont été observés chez les lapin DB (*dutch belted*) ayant subi une injection intraveineuse de Stx2 (1,2 ng/kg), et la sévérité des symptômes était dose-dépendante (García et al., 2008). De plus, le lapin a également permis de développer des modèles d'étude des atteintes du système nerveux central (Fujii et al., 1996; Takahashi et al., 2008).

Points clés

- Les EHEC possèdent de **nombreux gènes impliqués dans la pathogénicité**. Les deux facteurs de virulence majeurs des EHEC sont le **T3SS** et les **Stx**.
- Les EHEC possèdent de multiples **mécanismes d'adaptations** aux conditions environnementales auxquelles ils sont confrontés durant le transit à travers de tractus digestif, notamment le **pH acide**, la présence de **sels biliaires** ou la disponibilité variable en **O₂**.
- L'adhérence des EHEC aux cellules épithéliales se fait principalement par l'intermédiaire de l'**intimine, une adhésine membranaire codée par le gène *eae***, qui se fixe au **récepteur Tir**, injecté dans la cellule hôte par le T3SS. Cette fixation a pour conséquence la formation des **lésions A/E au niveau de l'épithélium intestinal**.
- Les **Stx produites** par les EHEC se fixent sur le **récepteur Gb3**, présent principalement sur les cellules endothéliales vasculaires, puis induisent l'**apoptose des cellules intoxiquées**, à l'origine des manifestations cliniques, en particulier rénales et neurologiques.
- Les EHEC possèdent plusieurs mécanismes pour **résister** à la mise en place de la **réponse immunitaire**, et notamment la production de NO.
- Les **modèles *in vivo*** existants pour étudier la pathogénicité des EHEC sont **nombreux**, mais aucun ne permet de reproduire l'ensemble des caractéristiques de l'infection chez l'Homme, ce qui **limite le développement des connaissances** sur le processus infectieux des EHEC.

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET QUESTIONS DE RECHERCHE

Deux axes de recherche ont été explorés dans ce travail de thèse. Le premier repose sur le fait que les mécanismes avérés de la pathogénicité des EHEC caractérisés à ce jour ne suffisent pas à expliquer la différence de virulence entre les souches de STEC. L'hypothèse associée à cette observation est donc qu'il existe d'autres facteurs de virulence ou accessoires de la virulence qui ne sont pas encore connus ou non caractérisés *in vivo*. L'objectif était donc d'identifier des gènes d'EHEC induits *in vivo* lors d'une infection en modèle murin afin d'identifier de nouveaux déterminants bactériens potentiellement impliqués dans le processus infectieux.

Le second axe de ma thèse s'intéresse aux dialogues moléculaires mis en jeu entre l'hôte et le pathogène, qui sont la clé de l'évolution de la pathologie dans toutes les infections, mais qui sont peu connus dans le cas des EHEC. Parmi les réponses de l'hôte à l'infection, il y a production de NO au niveau de la muqueuse intestinale. Il a précédemment été montré *in vitro* au laboratoire que le NO inhibe la production de Stx ainsi que l'adhérence des EHEC aux cellules épithéliales intestinales en agissant sur les gènes codant le T3SS. L'objectif était donc de caractériser la réponse des EHEC au stress nitrosant *in vivo* afin de mieux appréhender les interactions entre EHEC, NO et hôte.

Les questions de recherche associées à ces hypothèses de travail sont donc :

- ❖ **Quels sont les facteurs de virulence et de fitness mis en jeu dans les premiers stades de l'infection ?**
- ❖ **Quel est le rôle *in vivo* du NO dans la pathophysiologie d'une infection à EHEC ?**
- ❖ **Quels sont les mécanismes moléculaires qui régissent les interactions entre EHEC, NO et hôte *in vivo* ?**

RESULTATS

Chapitre I :

*Identification de nouveaux déterminants
potentiels de la virulence chez les EHEC*

Identification et prévalence de gènes induits in vivo chez Escherichia coli entérohémorragique

Contexte et synthèse de l'étude

Le pathogène *Escherichia coli* entérohémorragique constitue une cause fréquente de toxoinfection alimentaire chez l'Homme à l'origine de diarrhées, pouvant rapidement évoluer vers des symptômes graves comme le SHU et le PTT. Les deux principaux facteurs de virulence identifiés chez les EHEC sont les Shigatoxines (Stx) et le système de sécrétion de type III (T3SS). Le T3SS, codé par les gènes du LEE, est impliqué dans l'adhésion intime des bactéries aux entérocytes et dans la formation des lésions d'attachement et d'effacement, via l'injection d'effecteurs bactériens dans les entérocytes. Les Stx, produites dans la lumière intestinale, traversent la barrière épithéliale intestinale pour rejoindre la circulation sanguine puis engendrer des lésions sur les organes cibles, tels que les reins et le cerveau.

Cependant, certaines souches de STEC, isolées d'animaux ou d'aliments, n'ont jamais été impliquées dans des cas cliniques. Il semble donc que les Stx sont nécessaires mais pas suffisantes pour provoquer une pathologie chez l'Homme, et que plusieurs facteurs de virulence combinés sont requis pour cela. De plus, certaines souches d'EHEC ne possédant pas le LEE sont responsables d'infections humaines, ce qui suggère la présence d'autres déterminants permettant la colonisation de la muqueuse intestinale. On sait qu'il existe de nombreux facteurs potentiellement associés à la virulence, notamment codés par des gènes présents sur des plasmides, comme pO157, ou sur des îlots de pathogénicité, mais pour la plupart, leur fonction et leur contribution dans le processus infectieux des EHEC restent inconnues. Ainsi, la pathophysiologie des infections à EHEC chez l'Homme est loin d'être complètement définie et il est nécessaire d'élargir nos connaissances sur ce sujet. L'objectif de ce travail était donc d'identifier et de caractériser des «facteurs auxiliaires» qui permettraient aux EHEC d'induire des symptômes cliniques chez l'Homme.

Dans cette étude, la technologie RIVET (*recombinase-based in vivo expression technology*) appliquée à la souche d'EHEC de référence EDL933 en modèle murin a permis d'identifier 31 gènes *ivi* (*in vivo induced*), principalement impliqués dans le métabolisme général, la réponse au stress ou de fonction inconnue. La prévalence de ces gènes a été étudiée dans une collection de souches d'EHEC circulant en France entre 2015 et 2016. 8 gènes ont été identifiés comme ayant une distribution hétérogène dans ces souches avec notamment une prévalence élevée dans les souches du Top 7 (O157:H7 ; O26:H11 ; O103:H2 ; O146:H21 ; O91:H21 ; O145:H28 ; O80:H2), et plus particulièrement dans des souches possédant des gènes de virulence comme *stx2* et *eae*. Par ailleurs, une étude de compétition en modèle murin entre

la souche EDL933 WT et déletée de certains gène *ivi* a permis d'identifier l'implication de 2 gènes dans le fitness de la souche lors de l'infection.



Ainsi, ce travail a mis en évidence des gènes, surexprimés *in vivo*, codant des facteurs de niche qui pourraient accroître le potentiel des souches d'EHEC à provoquer des maladies chez l'homme.

*Cette étude a été initiée avant le début de la thèse. Ainsi, avant mon arrivée, la banque de gènes avait déjà été construite et criblée et les mutants de délétion chez EDL933 avait été créés. Ma contribution a donc porté sur les autres aspects de l'étude, principalement l'analyse de prévalence des gènes *ivi*.*

RESEARCH PAPER



Identification and prevalence of *in vivo*-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

Marion Gardette^{a,b}, Simon Le Hello^{c,d}, Patricia Mariani-Kurkdjian^e, Laetitia Fabre^c, François Gravey^{c,d}, Annie Garrivier^a, Estelle Loukiadis ^{b,f}, and Grégory Jubelin ^a

^aUCA, INRA, UMR454 MEDIS, Clermont-Ferrand, France; ^bLaboratoire d'écologie microbienne de Lyon, Université de Lyon, CNRS, INRA, UCBL, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France; ^cCentre de Référence National des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France; ^dUniversité de Normandie, EA 2656 GRAM 2.0, UNICAEN, Caen, France; ^eService de Microbiologie, Centre National de Référence associé *Escherichia coli*, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France; ^fLaboratoire national de référence des *E. coli*, Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France

ABSTRACT

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are food-borne pathogens responsible for bloody diarrhoea and renal failure in humans. While Shiga toxin (Stx) is the cardinal virulence factor of EHEC, its production by *E. coli* is not sufficient to cause disease and many Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) strains have never been implicated in human infection. So far, the pathophysiology of EHEC infection is not fully understood and more knowledge is needed to characterize the “auxiliary” factors that enable a STEC strain to cause disease in humans. In this study, we applied a recombinase-based *in vivo* expression technology (RIVET) to the EHEC reference strain EDL933 in order to identify genes specifically induced during the infectious process, using mouse as an infection model. We identified 31 *in vivo*-induced (*ivi*) genes having functions related to metabolism, stress adaptive response and bacterial virulence or fitness. Eight of the 31 *ivi* genes were found to be heterogeneously distributed in EHEC strains circulating in France these last years. In addition, they are more prevalent in strains from the TOP seven priority serotypes and particularly strains carrying significant virulence determinants such as Stx2 and intimin adhesin. This work sheds further light on bacterial determinants over-expressed *in vivo* during infection that may contribute to the potential of STEC strains to cause disease in humans.

ARTICLE HISTORY

Received 10 December 2018
Revised 25 January 2019
Accepted 6 February 2019

KEYWORDS


EHEC; intestinal pathogen; virulence; metabolism; stress response; gene prevalence; RIVET

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are recognized as an important cause of food-borne disease in humans and cause large outbreaks worldwide. Pathogenic STEC, designated as enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), are responsible for intestinal disorders, including watery or bloody diarrhoea, that may ultimately evolve to life-threatening diseases such as haemolytic uraemic syndrome (HUS) or thrombotic thrombocytopenic purpura. The two cardinal virulence factors in EHEC are type III secretion system (T3SS) and Shiga toxins (Stx). T3SS, encoded by the Locus of Enterocyte Effacement (LEE), is involved in the formation of attaching and effacing (A/E) lesions on gut mucosa through the injection of specific effectors within enterocytes [1]. Interactions of bacterial effectors with eukaryotic signal transduction pathways lead to host cytoskeleton reorganization that is characterized by two key markers of A/E lesions: an effacement of

microvilli and formation of pedestals beneath adherent EHEC. Among translocated bacterial proteins, Tir is crucial since it acts as a receptor for the adhesin intimin (encoded by gene *eae*), upon its integration into the host cell plasma membrane [2]. Strong interaction between intimin and Tir leads to an intimate attachment of EHEC to infected epithelial cells. Thirty distinct intimin subtypes with variation in their C-terminal part (involved in Tir binding) have been described so far [3] and this represents a standard tool for typing EHEC strains as well as for epidemiological studies. The biological significance of *eae* subtypes is not known but it has been suggested that intimin variants may be responsible for different host tissue cell tropisms [4]. The other cardinal virulence factor in EHEC is Stx, which is produced in the gut lumen and crosses the epithelial barrier to reach the bloodstream and the target organs including brain and kidneys. Stx binds specifically to globotriaosylceramide, a receptor present at the surface of glomerular

CONTACT Grégory Jubelin  gregory.jubelin@inra.fr

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

endothelial cells, and blocks the translation in intoxicated cells resulting in cell death by apoptosis [5]. Two antigenically distinct forms of Stx can be produced by STEC, Stx1, and Stx2, and for each type of Stx up to seven subtypes have been described to date [6]. Stx2-producing *E. coli* strains, especially subtypes Stx2a and Stx2d, are more often associated with the most severe symptoms of the disease than Stx1-producing strains [7,8].

Because Stx induces bloody diarrhoea and renal dysfunction in infected patients, the toxin is considered as the main virulence factor of EHEC. However, many STEC strains isolated from the animal reservoir or from food products have never been associated with human infection and these strains have been classified as seropathotype E by Karmali and colleagues [9]. While several hypotheses could explain the occurrence of these putative non-pathogenic STEC strains (cryptic *stx* gene, undetected cases of human infection, weak EHEC survival during transmission to human, etc.), one hypothesis relies on the idea that Stx is necessary but not sufficient to cause disease in humans and that a minimal combination of virulence factors (including Stx) is required. In accordance with this hypothesis, epidemiological studies have emphasized that LEE is frequently associated with severe STEC infections [10,11]. However, about 10% of the confirmed STEC cases reported in the European Union between 2007 and 2010, including HUS patients, were caused by LEE-negative STEC strains [11]. These strains probably utilize other determinants to colonize the gut mucosa efficiently. Apart from intimin, EHEC produces many other potential adhesins or fimbriae that have been primarily described *in vitro* [12]. Similarly, many EHEC strains also carry large plasmids including the pO157 which encodes potential virulence factors such as the enterohaemolysin EhxA whose gene is used as a genetic marker for epidemiological studies [13]. However, the contribution of these determinants to the EHEC infectious process still needs to be evaluated. Over the past 15 y, the genome sequencing of many EHEC strains has provided new insights into their potential virulence determinants. In particular, the presence of additional DNA segments termed O-islands in the EHEC genome was linked to virulence potential since they contain several genes associated with virulence, including *stx*- and T3SS-encoding genes [14,15]. However, these O-islands also carry hundreds of genes of unknown predictive function that might be involved in EHEC infectious process. The pathophysiology of STEC infection in humans is therefore still far from being fully understood and more knowledge is needed to

characterize the “auxiliary” factors that enable a STEC strain to cause disease in humans.

In this study, we applied a recombinase-based *in vivo* expression technology (RIVET) to the EHEC reference strain EDL933 in order to identify genes specifically induced during the infectious process, using mouse as an infection model. These *in vivo*-induced (*ivi*) genes would give us a subclass of genes encoding products potentially important for STEC pathogenesis. Thirty-one *ivi* genes have been identified and most of them are linked to general metabolism or to stress adaptive responses, or have poorly characterized functions. Among them, eight genes were not homogeneously distributed in *E. coli* and their prevalence was analysed in EHEC strains circulating in France these last years. Finally, the potential role of selected *ivi* genes in EHEC fitness has been investigated by competition assays in mice.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. The well-characterized O157:H7 EDL933 strain, which is *stx1a*⁺, *stx2a*⁺, and LEE⁺, was used throughout this study. The EDL933 mutants $\Delta mhpR$, $\Delta yhbU$, $\Delta yftE$, $\Delta yjiR$, $\Delta Z4799$, $\Delta Z4070$ and $\Delta Z3135$ were constructed using the one-step PCR-based method [16]. Chromosomal deletion mutations were confirmed by PCR followed by DNA sequencing. The $\Delta agaF$ mutant was obtained using primers described in [17]. Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C unless otherwise indicated. For strain WM3064, 2,6-diaminopimelic acid (DAP) was added to a concentration of 100 μM . When required, antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (Amp), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; kanamycin (Kan), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; gentamicin (Gm), 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; chloramphenicol (Cm), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; streptomycin (Sm), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Construction of an EHEC RIVET library

The EHEC RIVET library used in this study has been constructed using tools from the improved RIVET method described by Osorio *et al.* [18]. The strains used to construct the RIVET library, designated EDL-RES and EDL-RES1, are spontaneous streptomycin-resistant (Sm^R) strains, harbouring a chromosomally located cassette, respectively, *res-kan-sacB-res* or *res1-kan-sacB-res1*. The strains were constructed by amplifying a cassette composed of *kan* and *sacB* genes and

flanked by *res* sequences from plasmid pRES or pRES1 with primers RES-F (5'-AAGCTGGAGCTCCACCGC-3') and RES-R (5'-GATCGGGCCCACTATAGGGC GAATTGGGTACC-3'). The PCR products were digested with *SacI* and *ApaI* and inserted into the corresponding sites of pGP-Tn7-Gm. The corresponding constructs, pGP-Tn7-RES and pGP-Tn7-RES1, were then transferred to EDL933-Sm^R by mating experiments in order to integrate the *kan-sacB* cassette into the chromosome as described in [19]. Correct insertion of the cassette was validated by PCR and sequencing. Sucrose sensitivity of EDL-RES and EDL-RES1 strains was validated on LB plates without NaCl supplemented with 4% sucrose.

The EHEC RIVET library was constructed as follows. Genomic DNA from strain EDL933 was partially digested with *Sau3AI*. Fragments between 0.5 and 3 kb were gel-purified and cloned into the *BglII* site of vectors pGOA1193 or pGOA1195. The ligation mixtures were transformed into PIR1 strain. Transformants were selected on plates with Amp and pooled to perform a plasmid extraction en masse. The plasmid library was then transformed into WM3064, a strain used as the donor to mobilize plasmids into EDL-RES or EDL-RES1 by mating experiments, leading to plasmid integration into the EHEC genome due to its *oriR6K* origin of replication. Approximately 21,000 colonies, obtained on LB agar supplemented with Amp and Kan, were collectively resuspended and aliquots were frozen at -80°C in 20% glycerol.

Screening of the RIVET library for *in vivo*-induced genes

An aliquot of the RIVET library was grown 6 h at 37°C in LB with Amp and Kan. Bacteria were washed once in PBS and approximately 5.10⁹ CFU was intragastrically administered to 6-week-old BALB/c mice. After 18 h of infection, mice were euthanized and faeces or large intestine contents were collected and homogenized in sterile PBS. Serial dilutions were next spotted on LB agar + Sm or LB agar without NaCl + Sm and 4% sucrose. The plates were incubated for 16 h at 30°C. Individual sucrose-resistant colonies were tested for their sensitivity to Kan and resistance to Amp. Correct clones were grown in LB + Amp + Gm in 96-well plates and stored at -80°C in 20% glycerol. DNA flanking the 5' end of *tnpR* was amplified for each individual clone by SP-PCR [20] using the primer SP-PCR#1 (5'-ATGACGTCACCTTCCTCCAC-3') and sequenced using the primer SP-PCR#2 (5'-AGATGCGATTGCTTTC ACG-3'). Obtained sequences were compared with the EHEC EDL933 genome using the MicroScope platform

(<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>).

Construction of p_{chuA}-*tnpR* fusion strains

EDL-RES and EDL-RES1 strains carrying *tnpR* gene under the control of *chuA* promoter region were constructed as follows. First, *chuA* promoter was amplified from genomic DNA of EDL933 using primers ChuA-F (5'-GAAGATCTCGCAGGATAGGTTTCATAACC-3') and ChuA-R (5'-GAAGATCTTAGCGATTCTCCAT GAGGA-3'), which contain *BglII* restriction sites in their 5' ends. PCR product and vectors pGOA1193, pGOA1194 and pGOA1195 were digested with *BglII* and ligated separately to yield plasmids p1193-*chuA*, p1194-*chuA* and p1195-*chuA*. Correct orientation of *chuA* promoter was validated by PCR and sequencing. Plasmids were mobilized into EDL-RES and EDL-RES1 strains by mating experiments. Plasmid insertion into the *chuA* locus was verified by PCR and sequencing.

Resolution assays

Excision of the RES marker cassette was monitored *in vitro* after growth in LB or *in vivo* after mouse infection. The percentage of bacteria that have lost the RES marker cassette, which is termed resolution, is calculated for an individual sample by dividing the titre on LB without NaCl agar plates with Sm and 4% sucrose by the titre on LB agar plates with Sm.

Gene prevalence analyses

Distribution of *ivi* genes in 51 selected *E. coli* strains (listed in Table S2) was performed using the MicroScope platform (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>) and completed when necessary using the BLAST program from the NCBI website. Then, distribution of eight *ivi* genes was evaluated on 228 selected strains obtained from the surveillance of EHEC infections from the French National Reference Centre for *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*, Institut Pasteur, France (NRC). This collection represented all the 196 clinical EHEC strains received at NRC between 2015 and 2016 (n = 95 and 101, respectively, one clinical strain per patient) and was completed by food or environmental strains isolated in 2016 encompassing the serotype diversity. All the 32 non-human strains were isolated at the National Reference Laboratory, VetAgro Sup, France (LNR). Basic information as origin of isolates (human or food), year of isolation, clinical symptoms, and microbiological characteristics are shown in Table S3.

High-throughput whole-genome sequencing (WGS) was carried out on all *E. coli* strains at the “Plateforme de microbiologie mutualisée” (P2M) from the Pasteur International Bioresources network (Institut Pasteur, Paris, France). DNA extraction was carried out by using the MagNAPure 96 system (Roche). The libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina) and the sequencing was done with the NextSeq 500 system (Illumina) generating 100 to 146 bp paired-end reads. Reads were trimmed and filtered using AlienTrimmer [21] with a quality Phred score threshold of 13 on a minimum length of 30 nucleotides. *De novo* assembly was performed with the SPAdes V.3.6.0 assembler [22]. Various genetic analyses were determined on SPAdes assembled sequences with web-based tools for WGS analysis developed by the Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/>). In particular, we searched O and H molecular serotyping, Multi-Locus-Sequence Typing (MLST) and main virulence gene content, i.e. *stx1* and *stx2* variants, *eae* variants, and *ehxA*. Furthermore, we extracted from each genome all the genes defining the phylogroup scheme [23]. A core-genome multi-alignment of all assembled genomes including an O157 *E. coli* reference genome (NC_002695) was done using the harvest v1.0.1 f ParSNP function [24]. The resulting single nucleotide polymorphisms (SNPs) were concatenated to generate a filtered multiple alignment that was used as input for the construction of a phylogenetic tree using MEGA6 [25], utilizing a maximum-likelihood (ML) approach. The final trees were visualized in the interactive Tree Of Life [26]. All genomes listed in supplementary Table S3 were uploaded on Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli>) under the name indicated in “file NRC” item.

Competition assays

Each of the *ivi* gene deletion strains was tested *in vivo* during competition assays in mice to evaluate if gene inactivation affects the bacterial fitness of EDL933 as previously described [27]. Briefly, individual EDL933 mutant and the wild-type (WT) strain were grown to mid-exponential phase in LB, washed once with PBS and mixed 1:1. Approximately 10^7 CFU of both strains were administered intragastrically into 10 to 15 BALBc mice, 6 weeks of age, that were previously given drinking water containing Sm (5 g/L) for 24 h in order to selectively remove facultative anaerobic bacteria and open the niche for *E. coli* [27]. Eight days post-infection, faecal pellets were resuspended in PBS and plated on LB agar plates + Sm and LB agar plates + Sm + Kan to count WT + *ivi* mutant and *ivi* mutant alone, respectively. The WT population was obtained by subtracting CFU from LB + Sm + Kan plates to CFU from LB + Sm plates. Results are expressed as competitive indices obtained by dividing output ratio (WT/mutant day 8 post-infection) by the corresponding input ratio (WT/mutant from mouse inoculum).

Statistical analyses

Clinical and microbiological data were entered anonymously. The Chi-square test or Fisher exact tests for proportions were performed. A *p*-value of <0.05 was considered significant. We used STATA version 12.0 (Stata Corporation, Texas, USA) for these analyses. Data in Figures 1 and 2 are presented as the mean \pm the standard deviation of at least three independent experiments. Data in Figure 4 are presented as the median of two or three independent experiments depending on tested genes. ROUT method has been applied to exclude

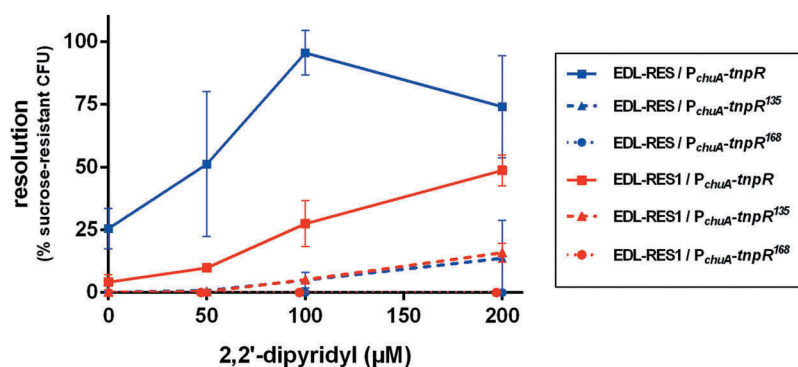


Figure 1. Efficiency of the RIVET system in EHEC. Indicated strains carrying *tnpR* gene under the control of *chuA* promoter were grown in LB supplemented with various concentrations of 2,2'-dipyridyl. After 6 h of growth, cultures were enumerated on LB plates and on LB + sucrose plates to calculate the percentage of resolved CFU. Results are presented as mean and standard deviations from at least three independent experiments. Blue and red curves represent resolution obtained from the 3 *tnpR* variants inserted into EDL-RES and EDL-RES1 strains, respectively.

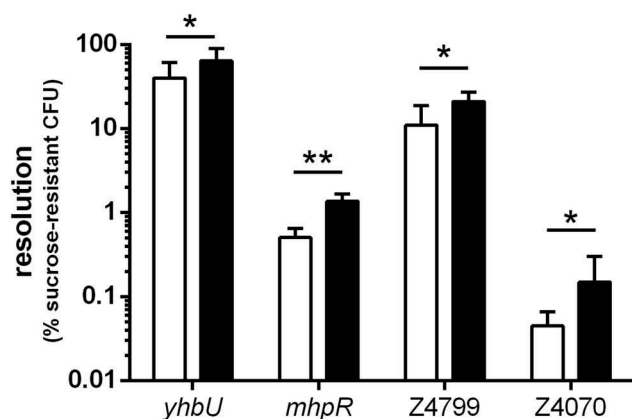


Figure 2. Resolution of selected *ivi* genes following *in vitro* or *in vivo* growth. EDL-RES strain carrying transcriptional fusion between indicated gene promoters and *tnpR* gene were either grown *in vitro* for 6 h in LB or were given to mice by oral gavage and feces were collected 16 h post-infection. Samples were then diluted and plated on LB plates or LB + sucrose plates to calculate the percentage of resolved CFU after *in vitro* growth (white bars) or following mouse challenge (black bars). Results are presented as mean and standard deviations from at least three independent experiments. Differences between *in vitro* and *in vivo* conditions were analyzed by a two-tailed unpaired t-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

outliers. Student's t-test or ANOVA with Fisher's LSD test was used to determine significant differences between two or several test groups, respectively. We used PRISM version 6.01 (GraphPad software, Inc) for these analyses.

Ethics Statement. Animal experiments were reviewed and approved by the Auvergne Committee for Animal Experimentation (C2E2A). All procedures were carried out according to the European directives for the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU, and to the guidelines of the local ethics committee.

Results

Validation of the RIVET method in EHEC

To evaluate the efficiency of the RIVET method described by Osorio *et al.* [18] in EHEC, we placed the reporter gene *tnpR* under the control of the promoter region of *chuA*, for which expression is well known to be induced in iron starvation conditions [28]. Transcriptional fusions were made with three different alleles of *tnpR* (*tnpR*, *tnpR*¹³⁵, *tnpR*¹⁶⁸) and transferred to EDL-RES or EDL-RES1 strains that carry the RES or RES1 cassette carrying *sacB* and *kan* genes (see M&M), respectively (Table S1). These RES cassette variants and *tnpR* alleles have been conceived in order to detect a wider range of *ivi* genes through alteration of cassette excision and *tnpR* translation

efficiencies, respectively [18]. Resolution (i.e. percentage of bacterial cells that have lost the RES cassette) was quantified after 6 h of growth in LB supplemented with various concentrations of the iron chelator 2,2'-dipyridyl (Figure 1). In the presence of 2,2'-dipyridyl, the level of resolution increased for each strain except for strains carrying the *P*_{chuA}-*tnpR*¹⁶⁸ fusion, which were therefore not used thereafter. In addition, patterns of resolution were different between the strains. The strain most sensitive to iron starvation was EDL-RES carrying the *P*_{chuA}-*tnpR* construct since it reached almost 100% resolution. Strain EDL-RES1 carrying the same construct was less sensitive to iron deficiency, with a maximal resolution of 49%. This result was expected since the RES1 cassette is excised by TnpR with a lower efficiency in comparison with the original RES cassette [18]. Both strains harbouring the *P*_{chuA}-*tnpR*¹³⁵ construct had a low resolution that did not exceed 15%. Taken together, these results indicate that the RIVET strategy based on RES cassette – *tnpR* combination can be readily used in EHEC and that the use of different alleles of *tnpR* and RES cassettes may allow the identification of promoter regions with a broad range of promoter strength.

Identification of *in vivo*-induced genes in EHEC using mouse as a host model

A genomic library of EHEC O157:H7 strain EDL933 was constructed by cloning random genomic DNA fragments upstream of *tnpR* genes (see M&M for details). More than 21,000 clones were obtained in EDL-RES or EDL-RES1 strains after selection on plates with kanamycin. Resistance to kanamycin implies that these clones still harbor the RES cassette and consequently do not carry an *in vitro* active promoter upstream of *tnpR*. The library was then inoculated intragastrically to conventional BALB/c mice. After 18 h of infection, bacteria were recovered from faeces either on LB with Sm to quantify the total number of EHEC or on LB with Sm and sucrose to select resolved strains. The percentage resolution after infection ranged from 0.01% to 6.75% between mice with a mean of 2.43%. We isolated a total of 1051 sucrose-resistant clones and 506 were confirmed to be sensitive to kanamycin. The DNA insert sequence was obtained from 335 isolates and 32 unique clones with integrated genes in the same orientation as *tnpR* were identified. Two clones correspond to the same gene (Z4799), thus leading to a list of 31 *in vivo*-induced (*ivi*) genes (Table 1). To validate our screening, we arbitrarily chose four genes and reconstructed transcriptional fusion with *tnpR* in EDL-RES strain. For each construct, resolution

Table 1. List of *in vivo*-induced genes identified in EHEC O157:H7 strain EDL933.

COG category	Gene		O-island	Role or putative function
	label	name		
Metabolism				
[C]	Z0072	<i>araB</i>		L-Ribulokinase
[C]	Z4726	<i>nirB</i>		Large subunit of nitrite reductase
[E]	Z3960	<i>gabT</i>		4-Aminobutyrate aminotransferase
[E]	Z3500	<i>glpB</i>		<i>sn</i> -Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
[E]	Z2551	<i>trpA</i>		α -Subunit of tryptophan synthase
[E]	Z0607	<i>ybaT</i>		Putative nitrogen-containing metabolite transporter
[E]	Z5746	<i>yjeH</i>		Member of the APC superfamily of amino acid transporters
[G]	Z4486	<i>agaW</i>	OI#126	Enzyme of the N-acetylgalactosamine phosphotransferase system
[H]	Z2540	<i>btuR</i>		Cobalamin adenosyltransferase
[H]	Z0061	<i>pdxA</i>		4-Hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase
[I]	Z2315	<i>azoR</i>		NADH- α Zoreductase
[I]	Z5366	<i>fadA</i>		3-Ketoacyl-CoA thiolase
[P]	Z5611	<i>yjbB</i>		Putative transporter
Information storage and processing				
[J]	Z4409	<i>cca</i>		Multifunctional CCA protein
[K]	Z0444	<i>mhpR</i>		Transcriptional activator of 3-hydroxyphenylpropionic acid catabolism
[K]	Z0073	<i>araC</i>		Transcriptional regulator of L-arabinose transport and catabolism
[K]	Z4022	<i>ascG</i>		Transcriptional repressor of arbutin and salicin transport
[K], [E]	Z5941	<i>yjiR</i>		Putative transcriptional regulator
[K], [T]	Z4017	<i>norR</i>		Transcriptional activator of nitric oxide reductase NorV
[L], [U]	Z4799	-	OI#134	Putative DNA processing protein
Cellular processes and signaling				
[D]	Z5820	<i>ytfE</i>		Iron-sulphur cluster repair protein
[M]	Z4886	<i>yhil</i>		Putative HlyD family secretion protein
[M]	Z4926	<i>mdtE</i>		Multidrug efflux system protein
[G], [E], [P], [R]	Z5939	<i>mdtM</i> (<i>yjiO</i>)		Multidrug efflux system protein
[O]	Z4519	<i>yhbU</i>		Putative collagenase
[O]	Z4343	<i>yghU</i>		Putative glutathione S-transferase
[O]	Z4593	<i>degQ</i>		Serine endoprotease
Poorly characterized				
[R]	Z4070	-	OI#111	Uncharacterized protein
[R]	Z2757	<i>ydjM</i>		Uncharacterized protein; regulated by the SOS system regulator LexA
[R]	Z0964	-	OI#36	Putative DNA packaging protein of prophage CP-933K
No COG				
-	Z3135	-	OI#80	Putative adhesin/invasin

COG category: [C] Energy production and conversion; [D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; [E] Amino acid transport and metabolism; [G] Carbohydrate transport and metabolism; [H] Coenzyme transport and metabolism; [I] Lipid transport and metabolism; [J] Translation, ribosomal structure and biogenesis; [K] Transcription; [L] Replication, recombination and repair; [M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis; [O] Post-translational modification, protein turnover, and chaperones; [P] Inorganic ion transport and metabolism; [R] General function prediction only; [T] Signal transduction mechanisms; [U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport.

was recorded *in vitro* after growth in LB or *in vivo* after mice infection (Figure 2). For all strains, the resolution was higher following mouse infection than after *in vitro* growth, indicating that the expression level of each tested gene does indeed increase during the infectious process.

Functional classification of *ivi* genes

Functional categories of the 31 *ivi* genes were assigned using the COG database [29,30]. Thirteen genes (42%) had a COG associated with the general category metabolism, seven (22.5%) with the category information storage and processing, seven (22.5%) with the category cellular processes and signalling, three (10%) with the category poorly characterized and one (3%) had no COG assignment (Table 1). A large number of *ivi* genes are involved in the metabolism of *i*) carbohydrates: L-arabinose (*araB*, *araC*) and N-acetyl-galactosamine (*agaW*); *ii*) amino

acids: tryptophan (*trpA*), glutamate (*gabT*) and others (*yjeH*); *iii*) lipids: sn-glycerol-3P (*glpB*) and fatty acids (*fadA*); *iv*) vitamins: B₆ (*pdxA*) and B₁₂ (*btuR*); *v*) aromatic compounds: 3-hydroxyphenylpropionic acid (3HPP) (*mhpR*) and arbutin (*ascG*) or *vi*) nitrogen-containing metabolites (*nirB*, *ybaT*). The second largest class of *ivi* genes is related to stress resistance. Genes *mdtE* and *mdtM* encode subunits of multidrug efflux pumps. *yghU* encodes a glutathione S-transferase, and *yhil* encodes a putative protein belonging to the MFP family, which is involved in the export of a variety of compounds including drugs. Genes *ytfE* and *norR* are related to nitrosative stress since it encodes, respectively, an iron-sulphur repair protein and a transcriptional activator of the *norVW* operon, whose products are involved in nitric oxide detoxification. There were also a number of *ivi* genes with unknown or poorly characterized function (*ydjM*, *yhbU*, Z0964, Z4070, Z4799, Z3135)

Table 2. Distribution of eight *ivi* genes in 51 *E. coli* strains grouped as commensals, InPEC or ExPEC.

	<i>mhpR</i>	<i>ascG</i>	<i>mdtM</i>	<i>yjiR</i>	Z0964	Z3135	Z4070	Z4799
commensal (n = 6)	0.83	0.83	0.83	0.67	0.33	0	0.33	0.33
InPEC (n = 31)	0.97	0.97	0.97	0.74	0.71	0.52	0.68	0.35
EAEC (n = 3)	1	1	1	0.67	0.67	0	1	0
EHEC (n = 18)	1	1	1	1	0.78	0.72	0.72	0.5
EPEC (n = 4)	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.25	0.5	0.5
ETEC (n = 6)	1	1	1	0.17	0.5	0.33	0.5	0
ExPEC (n = 14)	0.5	0.71	0.43	0.43	0.5	0.21	0.14	0.5

Values indicate the proportion of strains carrying *ivi* genes (columns) for each category (lines).

Distribution of *ivi* genes in *E. coli*

We next analyzed *in silico* the distribution of *ivi* genes among 51 sequenced *E. coli* strains (Table S2). Twenty-three of the 31 *ivi* genes are highly conserved since they were detected in at least 98% of all strains. The eight other *ivi* genes present a prevalence ranging from 38% to 90% and half are located in O-islands [14] (Table 1 and S2). These genes encode transcriptional regulators (*mhpR*, *ascG* and *yjiR*), a protein from the Nle-encoding phage CP-933K (Z0964), a potential adhesin/invasin (Z3135), an efflux pump protein (*mdtM*), a putative DNA processing protein (Z4799) or an uncharacterized protein with a Cas3 domain (Z4070).

We next focused our attention on these eight *ivi* genes and analyzed their prevalence in the same *E. coli* collection after classification of strains as commensals, intestinal pathogens (InPEC) or extra-intestinal pathogens (ExPEC). As shown in Table 2, most of these *ivi* genes are not homogeneously distributed among the three categories. Interestingly, genes *mhpR*, *ascG*, *mdtM*, Z3135 and Z4070 present a higher prevalence in InPEC than in other groups ($p < 0.03$). Regarding the distribution of *ivi* genes in InPEC pathotypes, we observed that genes *yjiR* and Z3135 are more represented in EHEC than in other pathotypes ($p < 0.01$). Altogether, these data highlight a differential prevalence of several *ivi* genes in *E. coli*, with some of them being more represented within InPEC and/or EHEC groups, suggesting a potential role in the lifestyle of these pathogenic strains.

Distribution of *ivi* genes in EHEC strains circulating in France

To go further, we next evaluated the distribution of the eight *ivi* genes specifically in 228 EHEC strains isolated either from patients hospitalized in France between 2015 and 2016 or from contaminated foods (Table S3). The overall prevalence of the eight *ivi* genes ranges from 22% to 92%. First, we looked at the distribution of *ivi* genes in strains belonging to the 6 most commonly reported serotypes from severe cases of human STEC infections in the European Union [31] plus the emerging O80:H2 serotype [32,33] (defined here as the TOP seven priority serotype) versus other serotypes. We observed that all genes except Z3135 were more prevalent in strains from the TOP seven priority serotypes than in strains from other serotypes (Table 3; $p < 0.003$). Surprisingly, each *ivi* gene was almost exclusively present or absent in all strains from a given serotype (Table 3 and data not shown), suggesting a population-based distribution. For example, genes Z0964 and Z4799 were detected in all 27 O157:H7 strains but were not found in the genome of the 31 O26:H11 strains (Table 3). As the MLST types were concordant with the serotype, we found the same *ivi* gene distribution. Regarding their distribution by phylogroups (Table S4), some genes were more associated with a specific phylogroup than the others like genes Z0964 and Z4799 with phylogroup E and gene Z3135 with phylogroup A ($p < 0.01$). Distributions of the eight *ivi* genes according to serotype and phylogenetic population are shown in Figure 3.

Table 3. Distribution of the eight *ivi* genes in 228 EHEC strains classified by serotypes.

	<i>mhpR</i>	<i>ascG</i>	<i>mdtM</i>	<i>yjiR</i>	Z0964	Z3135	Z4070	Z4799
TOP 7 priority serotypes (n = 97)	1	1	1	0.82	0.37	0.66	0.77	0.46
O157:H7 (n = 27)	1	1	1	1	1	0.96	0.96	1
O26:H11 (n = 31)	1	1	1	1	0	0	1	0
O103:H2 (n = 2)	1	1	1	1	0	0.5	1	1
O146:H21 (n = 12)	1	1	1	1	0.08	1	1	1
O91:H21 (n = 4)	1	1	1	1	1	1	1	1
O145:H28 (n = 4)	1	1	1	1	1	1	0	0
O80:H2 (n = 17)	1	1	1	0	0	1	0	0
Other serotypes (n = 131)	0.86	0.87	0.86	0.77	0.11	0.58	0.72	0.24

Values indicate the proportion of strains carrying *ivi* genes (columns) for each category (lines).

Tree scale: 0.01

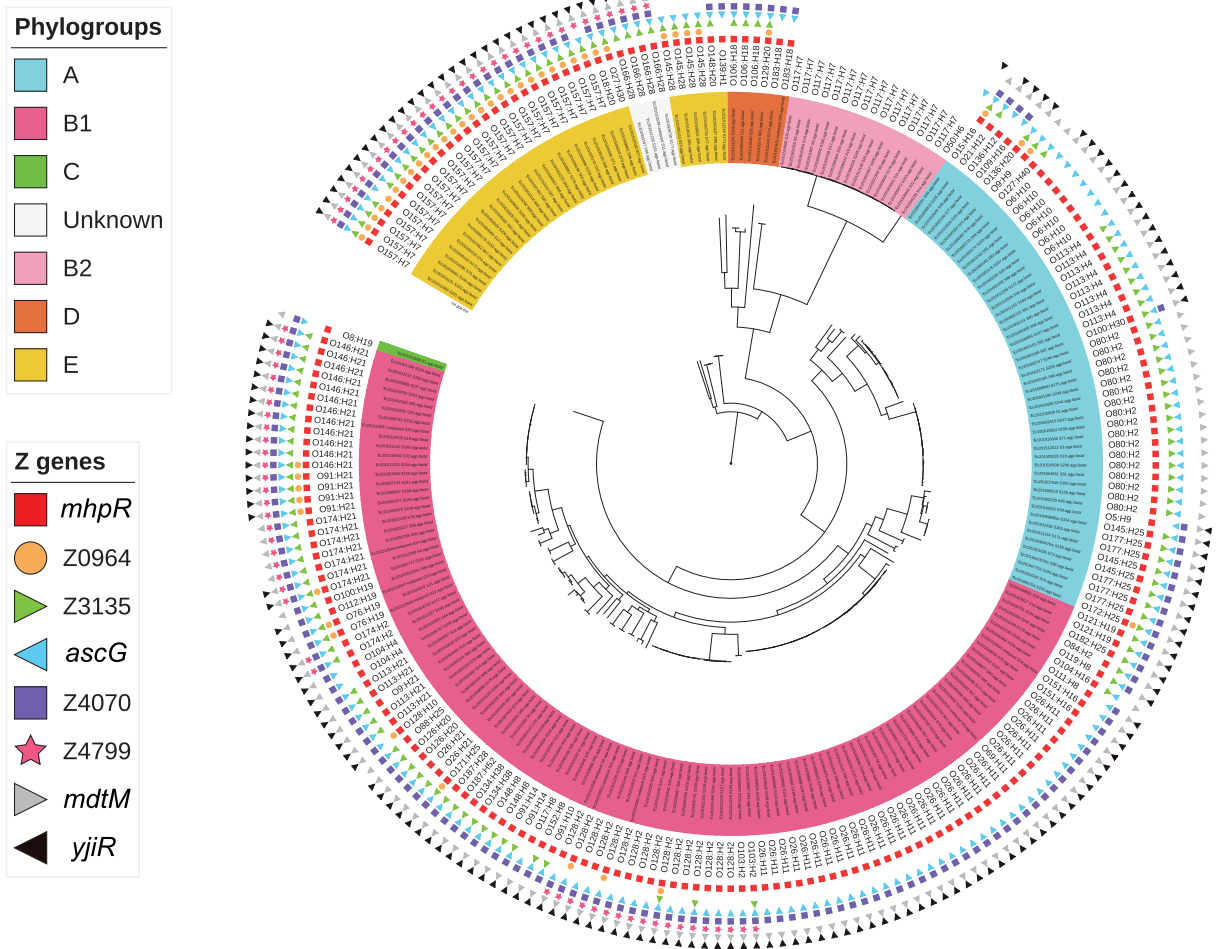


Figure 3. Distribution of the eight *ivi* genes in the EHEC strain collection. A phylogenetic tree was constructed after a core-genome multi-alignment with all 228 STEC strains and the O157 *E. coli* reference genome (NC_002695). Presence of each *ivi* gene is indicated by different coloured forms. Phylogroups are shown by coloring the numbering of each strain and serotypes are written. All this information is indicated at the end of each branch of the phylogenetic tree.

Table 4. Co-distribution of the eight *ivi* genes with known virulence factors in the EHEC strain collection.

	<i>mhpR</i>	<i>ascG</i>	<i>mdtM</i>	<i>yjiR</i>	Z0964	Z3135	Z4070	Z4799
<i>stx1</i> + <i>stx2</i> (n = 52)	1	1	1	1	0.37	0.71	0.92	0.67
<i>stx1a</i> + <i>stx2a</i> (n = 13)	1	1	1	1	0.38	0.62	1	0.38
<i>stx1a</i> + <i>stx2c</i> (n = 7)	1	1	1	1	1	0.86	1	1
<i>stx1a</i> + <i>stx2d</i> (n = 7)	1	1	1	1	0.43	1	0.71	0.43
<i>stx1c</i> + <i>stx2b</i> (n = 23)	1	1	1	1	0.17	0.61	0.91	0.87
<i>stx2</i> (n = 114)	0.99	1	0.99	0.76	0.23	0.75	0.75	0.3
<i>stx2a</i> (n = 39)	1	1	1	0.92	0.31	0.51	0.9	0.28
<i>stx2b</i> (n = 12)	0.92	1	0.92	1	0.17	0.5	0.92	0.83
<i>stx2c</i> (n = 17)	1	1	1	0.88	0.41	1	0.82	0.47
<i>stx2d</i> (n = 28)	1	1	1	0.46	0.07	0.96	0.32	0
<i>stx2e</i> (n = 3)	1	1	1	0	0.33	0.33	0.67	0
<i>stx2g</i> (n = 3)	1	1	1	0.67	0.33	1	1	0
<i>stx1</i> (n = 62)	0.73	0.73	0.73	0.68	0.1	0.27	0.56	0.11
<i>stx1a</i> (n = 46)	0.63	0.63	0.63	0.61	0.07	0.17	0.59	0.07
<i>stx1c</i> (n = 15)	1	1	1	0.93	0.2	0.53	0.47	0.27
<i>eae</i> ⁺ (n = 102)	1	1	1	0.82	0.31	0.62	0.77	0.28
<i>eae</i> β (n = 42)	1	1	1	1	0	0.17	1	0
<i>eae</i> γ (n = 31)	1	1	1	1	1	0.97	0.84	0.87
<i>eae</i> ε (n = 6)	1	1	1	1	0.17	0.83	1	0.33
<i>eae</i> θ (n = 3)	1	1	1	0.67	0	0.33	0.67	0
<i>eae</i> ξ (n = 17)	1	1	1	0	0	1	0	0
<i>eae</i> ⁻ (n = 126)	0.86	0.87	0.86	0.77	0.15	0.61	0.71	0.37

Values indicate the proportion of strains carrying *ivi* genes (columns) for each category (lines)
 NB: only categories with a strain number ≥3 are shown.

Table 5. Distribution of *stx*, *eae*, and the eight *ivi* genes in EHEC strains with regards to the symptoms they have caused in patients.

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 + stx2</i>	<i>eae</i>	<i>mhpR</i>	<i>ascG</i>	<i>mdtM</i>	<i>yjiR</i>	Z0964	Z3135	Z4070	Z4799
HUS (n = 34)	0.03	0.79	0.18	0.71	1	1	1	0.85	0.29	0.71	0.85	0.32
bloody diarrhoea (n = 33)	0.15	0.55	0.3	0.49	0.94	0.94	0.94	0.82	0.3	0.61	0.85	0.42
watery diarrhoea (n = 47)	0.26	0.43	0.32	0.4	0.98	0.98	0.98	0.87	0.19	0.64	0.81	0.47

Values indicate the proportion of strains carrying indicated genes (columns) for each category (lines).

We next evaluated the existence of a potential correlation between the presence of *ivi* genes and genes encoding characterized virulence factors. As shown in Table 4, all eight *ivi* genes were found to be more prevalent in strains harbouring *stx2* or *stx1 + stx2* than in strains carrying only *stx1* gene ($P < 0.001$). In contrast, only genes *mhpR*, *ascG*, *mdtM* and Z0964 were more prevalent in *eae*-positive strains than in *eae*-negative strains ($P < 0.01$). Interestingly, some *ivi* genes were found to be highly associated with particular intimin variants. For example, Z0964 was detected in all 31 strains carrying *eae* γ whereas it was only found in 1 of the 71 strains carrying other intimin variants (Table 4; $P < 0.001$). We finally investigated the distribution of *ivi* genes in strains for which we have clinical data in order to evaluate potential links between the presence of the 8 *ivi* genes in EHEC and severity of the induced disease. From our collection, 34 strains have been isolated from patients who have developed a HUS, 33 strains from patients with bloody diarrhoea and 47 strains from patients with watery diarrhoea. As expected, HUS-associated strains carry *stx2* and *eae* genes more frequently than strains causing diarrhoea only (Table 5, $p < 0.01$). In contrast, *stx1* is less prevalent in strains responsible for HUS. Regarding the eight *ivi* genes, no significant association was determined with clinical symptoms except for Z0964, which tends to be associated with HUS and/or bloody diarrhoea ($P = 0.07$).

Involvement of *ivi* genes in mouse gut colonization

We next assessed the potential role of some *ivi* genes in the gut colonization process. Seven *ivi* genes have been arbitrarily selected based on their function potentially associated with bacterial fitness or virulence. This includes, for example, genes encoding putative adhesin or collagenase as well as genes encoding proteins involved in particular metabolic pathways. Of note, five of the seven selected genes belong to *ivi* genes heterogeneously distributed in *E. coli* and in EHEC strains as described above. We individually deleted the coding sequence of these seven *ivi* genes in EDL933 and tested each mutant by a competition assay with the WT strain during mouse infection (Figure 4). As a control,

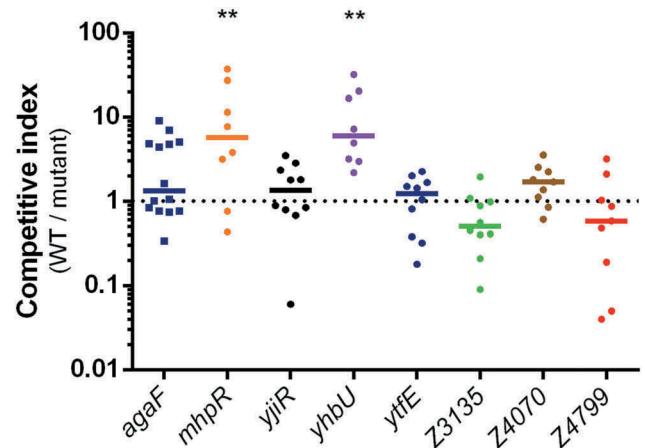


Figure 4. Impact of *ivi* gene deletion on the fitness of EDL933. Competition assays were performed by co-infecting mice with an equal mixture of EDL933 WT (Sm^R) and the indicated *ivi* gene mutant ($Sm^R Kan^R$). Eight days post-infection, faeces were sampled, homogenized in PBS, diluted and spotted on LB + Sm plates and LB + Sm + Kan plates to count, respectively, WT + *ivi* mutant and *ivi* mutant alone. The WT population was obtained by subtracting *ivi* mutant CFU from total EHEC CFU. Competitive indices (ratio WT/mutant) were calculated for each animal. Each dot represents one mouse and lines represent median values. Differences between each group and the control group *agaF* were analyzed by ANOVA with Fisher's LSD test (** $P < 0.01$).

we also performed competitive infection using a strain deleted for *agaF*, which has been shown to be as efficient as the WT strain in colonizing mouse gut [34]. Deletion of genes *ytfE*, *yjiR*, Z3135, Z4070 or Z4799 has no impact on EDL933 colonization efficiency since calculated competitive indices between the WT strain and each mutant were closed to 1. In contrast, inactivation of *mhpR* or *yhbU* altered the ability of EDL933 to colonize the gut since both mutants were significantly outcompeted by the WT strain (Figure 4).

Discussion

Since the first case of infection in the 1980s, the number of EHEC infections in humans has increased steadily and the pathogen is now recognized as a serious threat to human health. Stx and T3SS are the main virulence factors produced by EHEC strains, but the

combinations of genetic traits that render a STEC strain highly virulent in humans are still poorly known. In this study, we performed RIVET screening using the EHEC O157:H7 reference strain EDL933 to identify genes that are induced *in vivo*, suggesting their potential role during the course of infection.

Among the 31 *ivi* genes identified, most are involved in adaptation of the pathogen to the gastrointestinal tract (GIT), as has been demonstrated in other studies [35,36]. First, genes involved in the metabolism of carbohydrates including arabinose (*araB*, *araC*), N-acetyl-galactosamine (*agaW*) and β -glucosides (*ascG*) have been detected as *ivi* genes. Proteins from these three pathways were also shown to be specifically expressed by EHEC in infected patients [35]. Interestingly, C-source metabolic EHEC profiling has shown that arabinose and N-acetylglucosamine could be relevant for identification of recent diversification events among serogroups and could be linked with functional specialization for the most hazardous EHEC strains [37]. Additionally, the utilization of arabinose (but not N-acetyl-galactosamine) confers an advantage on EHEC in efficient colonization of the mouse gut [34]. *ivi* Genes also include genes required for the metabolism of amino acids (tryptophan, glutamate), vitamins (B₆, B₁₂), fatty acids and aromatic compounds. For the latter category, expression of gene *mhpR* is induced during mouse infection. We also showed that the WT EDL933 strain has a competitive advantage over the *mhpR* mutant in colonizing mouse intestine. MhpR is the transcriptional activator of the *mhpABCDFE* operon that encodes enzymes dedicated to the transformation of 3HPP into intermediates of the Krebs cycle [38,39]. 3HPP is found naturally in the GIT of animals including humans since it results from anaerobic bacterial metabolism of plant-derived flavonoids or aromatic amino acids. Taken together with a recent study demonstrating that *mhp* gene expression in EDL933 is higher after growth in the caecal content of human gut microbiota-associated rats than after growth in the caecal contents of axenic rats [36], these data strongly suggest that EDL933 utilizes gut microbiota-produced 3HPP to efficiently colonize the GIT. It is noteworthy that oxygen is required for 3HPP catabolism by Mhp enzymes, and it has been suggested that *E. coli* performs these transformation steps close to epithelial cells where oxygen diffuses from blood [38].

In addition to metabolic adjustment, EHEC adapts to the GIT through the expression of genes involved in stress responses. Indeed, genes encoding components of the efflux pumps MdtEF and MdtM as well as a putative HlyD family secretion protein (YhiI) were found to be induced *in vivo*. These membrane structures are specialized in the export of a variety of harmful molecules such as drugs [40]. Other stress response

pathways activated *in vivo* correspond to those involved in defence against nitrosative stress, with over-expression of the genes *mdtEF*, *ytfE*, and *norR*. The efflux pump MdtEF has been shown to protect *E. coli* against nitrosative stress during anaerobic respiration [41] and YtfE is an iron-sulphur cluster repair protein highly produced in the presence of nitric oxide (NO) through a direct regulation via the NO-sensing transcriptional regulator, NsrR [42,43]. NorR is a second NO-sensing transcriptional regulator that controls the expression of *norV* which encodes a NO reductase [42,43]. NorV by itself was identified as one of the *E. coli* O157:H7 proteins expressed during human infection [35]. Moreover, it has been shown that NorV plays an important role for NO detoxification under anaerobic conditions as well as for EHEC survival and Stx2 production within macrophages [44,45]. Authors of these works proposed *norV* as a direct virulence determinant for the pathogenesis of EHEC. We and others have also demonstrated that NO strongly affects the expression of both *stx* and LEE genes in EHEC, and therefore modulates the expression of key virulence factors [46–48]. Altogether, these data argue that establishment of an adapted response to nitrosative stress is a key component of both the adaptation of EHEC to the GIT and the control of its virulence program.

Despite the use of several *tnpR* and RES cassette variants to cover a broad range of promoter strength, genes encoding key virulence genes such as *stx* and LEE genes were not revealed in our screening. This finding has been already observed in other studies identifying *ivi* genes from different pathogens [18,49] and demonstrates that RIVET screenings do not provide an exhaustive list of fitness or virulence genes for a given pathogen. In addition to possible bias during construction of the library, identified *ivi* genes rely on their expression level during both *in vitro* and *in vivo* growth and can therefore be affected by experimental parameters (culture medium, animal model, infection route, bacterial inoculum dose, spatial and temporal sampling, etc.). Among these possibilities, absence of *stx* and LEE genes in our list of *ivi* genes might be explained by the fact that these genes are known to be expressed during growth in laboratory conditions and were probably discarded during the selection of inactive promoters *in vitro*. Nonetheless, several identified *ivi* genes are linked to processes known to affect the production of these two cardinal virulence factors. Indeed, gene *ydjM* is known to be part of the LexA regulon and its expression is highly induced following activation of the SOS system [50]. Strikingly, proteins encoded by

the SOS-induced genes *uvrB* and *uvrY* have been detected as immunogenic O157:H7 proteins in HUS patients [35]. This converges towards an activation of the SOS response during infection and, as a consequence, induction of Stx phage lytic cycle and Stx2 production and release [51]. [46,47,52] Our list of *ivi* genes also includes *btuR* encoding a cobalamin adenosyltransferase involved in the assimilation of vitamin B₁₂ [53] and *yjbB* encoding a transporter of inorganic phosphate [54]. Vitamin B₁₂ and inorganic phosphate were both identified as molecules affecting the expression of Stx2 synthesis in EHEC [55,56].

Among the 31 identified *ivi* genes, 8 belong to the accessory genome as they were recovered in 22% to 93% of the 228 EHEC strains circulating in France between 2015 and 2016. Among these eight *ivi* genes, three (*mhpR*, *ascG*, and *mdtM*) were absent only in O117:H7 strains. Three other genes (*yjiR*, Z4799, and Z4070) presented a population-based distribution, suggesting gene acquisition by an ancestor and vertical transmission. Distribution of the last two genes (Z0964 and Z3135) is very heterogeneous among EHEC strains and suggests the occurrence of multiple acquisition events by different strains in the course of evolution. We also investigated the co-distribution of the eight *ivi* genes with known virulence genes. All *ivi* genes were more prevalent in strains harboring *stx2* (alone or associated with *stx1*) than in strains carrying only *stx1* gene ($P < 0.001$) and four of them (*mhpR*, *ascG*, *mdtM*, and Z0964) were more prevalent in *eae*-positive strains than in *eae*-negative strains ($P < 0.01$). Since epidemiological surveys determined that EHEC strains producing Stx2 and T3SS are more associated with the risk of HUS development [10], this raises the question whether one or more of these *ivi* genes contribute to the virulence potential of highly pathogenic EHEC strains. We were not able to make significant associations between *ivi* genes and clinical symptoms using our EHEC collection. However, this may be due to the paucity of clinical information collected in our study and future investigations need to be carried out to address this question. Among the eight *ivi* genes heterogeneously distributed in EHEC, three of them encode well-described or putative transcription factors (TF). As already discussed above, *mhpR* is the transcriptional activator of the *mhpABCDE* operon involved in 3HPP catabolism. The second TF is *AscG*, a GalR-type TF which represses *ascFB* operon required for the transport and catabolism of arbutin, salicin, and cellobiose [57]. *AscG* has been shown to repress the *prpBCDE* operon involved in propionate catabolism [58]. Identification of the *mhpR* and *ascG* genes as *ivi* genes in our experiments suggests that EHEC would favour the utilization of 3HPP in the gut while limiting

the utilization of arbutin, salicin, cellobiose, and propionate. The third TF, *YjiR*, encodes a putative transcriptional regulator of the MocR family as it possesses a clear Helix-Turn-Helix domain and an aspartate aminotransferase domain. While most regulators of the MocR family are still uncharacterized, the archetypal protein of this family, *GabR*, has been characterized to induce expression of the *gabTD* operon and thus to confer on *Bacillus subtilis* the ability to utilize γ -amino-butyric acid (GABA) as a nitrogen source [59]. While *YjiR* has only 24% identity to *GabR*, our RIVET screening also identified the gene *gabT*, which encodes GABA aminotransferase, suggesting the use of GABA by EDL933 in the GIT. However, co-infection assays demonstrated that deletion of *yjiR* does not alter the fitness of EDL933 in the GIT of infected mice. Nonetheless, all these data provide information on several substrates that could constitute specific nutrients used by EHEC to efficiently colonize the GIT. Several other genes belonging to the eight *ivi* genes heterogeneously distributed in EHEC can be correlated with virulence potential. First, gene Z0964 is located within prophage CP-933K that also includes genes *nleB*, *nleC*, *nleD* and *nleH1* encoding several known effectors of the T3SS [60–62]. Second, gene Z3135 encodes a large protein (2661 amino acids) of unknown function that contains multiple repeated domains with an Ig-like fold. These motifs are largely found in bacterial surface proteins belonging to the inverse autotransporter family such as intimins and invasins and are often involved in bacterial pathogenicity [63]. Finally, Z4799 encodes a putative DNA-processing protein belonging to a widespread bacterial protein family sharing a highly conserved domain called pfam02481. It is of interest that two proteins of this family, *DprA* from *Streptococcus pneumoniae* and *Smf* from *B. subtilis*, have been reported to play a prominent role in natural transformation through binding to exogenous single-stranded DNA and direct interaction with recombinase *RecA* [64]. Whereas *E. coli* is not a naturally transformable bacterial species, it is tempting to speculate that Z4799 can participate in activation of the SOS system in the case of DNA damage and thus can modulate the production level of Shiga toxins associated with *RecA* activation.

In this study, we performed genetic screening to identify genes from the EHEC O157:H7 strain EDL933 that are over-expressed *in vivo* during mouse infection. Among the 31 identified genes, a large proportion is involved in metabolic functions or in stress responses. The remaining *ivi* genes have hypothetical or unknown functions and several of them are potentially associated with EHEC virulence or fitness. We also demonstrated that eight *ivi* genes are heterogeneously

distributed in EHEC strains circulating in France these last years. These genes are more prevalent in strains from the TOP seven priority serotypes, particularly strains carrying established virulence genes such as *stx* and *eae*. This work sheds further light on genes encoding niche factors that may increase the potential of STEC strains to cause disease in humans.

Acknowledgments

We thank Cindy Garnier, Luc Planeix, Mélanie Lemor and Valérie Rousseau for excellent technical assistance, Charlotte Renaudat for her help in statistical analysis and David Marsh for language editing. We acknowledge all French medical laboratories participating in the clinical network of Shiga-toxin producing-*Escherichia coli*. We also thank the NRL team for providing the food and animal *E. coli* strains. This work was funded by INRA, Institut Pasteur, Santé Publique France and the French Ministry of Agriculture.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Institut Pasteur; Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation; Santé Publique France; INRA.

ORCID

Estelle Loukiadis  <http://orcid.org/0000-0002-1631-6670>
Grégory Jubelin  <http://orcid.org/0000-0002-9902-0663>

References

- [1] Schmidt MA. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 2010;12(11):1544–1552.
- [2] Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, et al. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol.* 1999;32(1):151–158.
- [3] Ooka T, Seto K, Kawano K, et al. Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):488–492.
- [4] Phillips AD, Frankel G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1496–1500.
- [5] Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(11):2231–2240.
- [6] Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):EHEC-0024–2013.
- [7] Siegler RL, Obrig TG, Pysker TJ, et al. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(2):92–96.
- [8] Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, et al. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2006;43(9):1160–1167.
- [9] Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):4930–4940.
- [10] Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):497–503.
- [11] Messens W, Bolton D, Frankel G, et al. Defining pathogenic verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from cases of human infection in the European Union, 2007–2010. *Epidemiol Infect.* 2015;143(8):1652–1661.
- [12] McWilliams BD, Torres AG. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectr.* 2014;2(3).
- [13] Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157: h7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 2010;20(1):5–14.
- [14] Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature.* 2001;409(6819):529–533.
- [15] Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001;8(1):11–22.
- [16] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6640–6645.
- [17] Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, et al. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in bovine intestinal content. *Environ Microbiol.* 2013;15(2):610–622.
- [18] Osorio CG, Crawford JA, Michalski J, et al. Second-generation recombination-based *in vivo* expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine. *Infect Immun.* 2005;73(2):972–980.
- [19] Crepin S, Harel J, Dozois CM. Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in *Enterobacteriaceae*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(17):6001–6008.
- [20] Karlyshev AV, Pallen MJ, Wren BW. Single-primer PCR procedure for rapid identification of transposon insertion sites. *Biotechniques.* 2000;28(6):1078,1080,1082.
- [21] Criscuolo A, Brisse S. AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. *Front Genet.* 2014;5:130.
- [22] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455–477.

- [23] Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, et al. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* **2018**;4(7).
- [24] Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, et al. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* **2014**;15(11):524.
- [25] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* **2013**;30(12):2725–2729.
- [26] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **2016**;44(W1):W242–245.
- [27] Jones SA, Jorgensen M, Chowdhury FZ, et al. Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157: h7 in the mouse intestine. *Infect Immun.* **2008**;76(6):2531–2540.
- [28] Torres AG, Payne SM. *Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* **1997**;23(4):825–833.
- [29] Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science.* **1997**;278(5338):631–637.
- [30] Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, et al. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res.* **2015**;43(Database issue):D261–269.
- [31] The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *Efsa J.* **2017**;15(12):e05077.
- [32] Soysal N, Mariani-Kurkdjian P, Smail Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80: H2as a new therapeutic challenge. *Emerg Infect Dis.* **2016**;22(9):1604–1612.
- [33] De Rauw K, Thiry D, Caljon B, et al. Characteristics of Shiga toxin producing- and enteropathogenic *Escherichia coli* of the emerging serotype O80: H2isolated from humans and diarrhoeic calves in Belgium. *Clin Microbiol Infect.* **2018**;25(1):111.e5–111.e8.
- [34] Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, et al. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun.* **2008**;76(3):1143–1152.
- [35] John M, Kudva IT, Griffin RW, et al. Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157: H7 proteins expressed during human infection. *Infect Immun.* **2005**;73(5):2665–2679.
- [36] Le Bihan G, Jubelin G, Garneau P, et al. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157: H7 grown in vitro in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes. *Microbes Infect.* **2015**;17(1):23–33.
- [37] Kerangart S, Cournoyer B, Loukiadis E. C-source metabolic profilings of foodborne Shiga-toxin producing *E. coli* match serogroup differentiations and highlight functional adaptations. *Int J Food Microbiol.* **2018**;266:324–336.
- [38] Ferrandez A, Garcia JL, Diaz E. Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **1997**;179(8):2573–2581.
- [39] Torres B, Porras G, Garcia JL, et al. Regulation of the *mhp* cluster responsible for 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **2003**;278(30):27575–27585.
- [40] Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, et al. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol.* **2015**;6:377.
- [41] Zhang Y, Xiao M, Horiyama T, et al. The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **2011**;286(30):26576–26584.
- [42] Justino MC, Almeida CC, Goncalves VL, et al. *Escherichia coli* YtfE is a di-iron protein with an important function in assembly of iron-sulphur clusters. *FEMS Microbiol Lett.* **2006**;257(2):278–284.
- [43] Hutchings MI, Mandhana N, Spiro S. The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J Bacteriol.* **2002**;184(16):4640–4643.
- [44] Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, et al. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol Microbiol.* **2012**;85(3):492–512.
- [45] Shimizu T, Hirai S, Yokoyama E, et al. An evolutionary analysis of nitric oxide reductase gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Infect Genet Evol.* **2015**;33:176–181.
- [46] Branchu P, Matrat S, Vareille M, et al. NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157: H7LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog.* **2014**;10(1):e1003874.
- [47] Vareille M, de Sablet T, Hindre T, et al. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007**;104(24):10199–10204.
- [48] Ichimura K, Shimizu T, Matsumoto A, et al. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *MicrobiologyOpen.* **2017**;6(4).
- [49] Camilli A, Mekalanos JJ. Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Mol Microbiol.* **1995**;18(4):671–683.
- [50] Fernandez De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **2000**;35(6):1560–1572.
- [51] Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis.* **2000**;6(5):458–465.
- [52] Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **2015**;36(3):161–178.
- [53] Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, et al. Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem.* **2003**;278(42):41148–41159.
- [54] Motomura K, Hirota R, Ohnaka N, et al. Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli*: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation. *FEMS Microbiol Lett.* **2011**;320(1):25–32.

- [55] Chekabab SM, Jubelin G, Dozois CM, et al. PhoB activates *Escherichia coli* O157: H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation. *PLoS One*. 2014;9(4):e94285.
- [56] Cordonnier C, Le Bihan G, Emond-Rheault JG, et al. Vitamin B₁₂ uptake by the gut commensal bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* limits the production of Shiga Toxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)*. 2016;8(1).
- [57] Hall BG, Xu L. Nucleotide sequence, function, activation, and evolution of the cryptic asc operon of *Escherichia coli* K12. *Mol Biol Evol*. 1992;9(4):688–706.
- [58] Ishida Y, Kori A, Ishihama A. Participation of regulator AscG of the beta-glucoside utilization operon in regulation of the propionate catabolism operon. *J Bacteriol*. 2009;191(19):6136–6144.
- [59] Belitsky BR, Sonenshein AL. GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of gamma-aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2002;45(2):569–583.
- [60] Marches O, Wiles S, Dziva F, et al. Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens. *Infect Immun*. 2005;73(12):8411–8417.
- [61] Holmes A, Lindestam Arlehamn CS, Wang D, et al. Expression and regulation of the *Escherichia coli* O157: H7 effector proteins NleH1 and NleH2. *PLoS One*. 2012;7(3):e33408.
- [62] Gao X, Wang X, Pham TH, et al. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF-kappaB activation. *Cell Host Microbe*. 2013;13(1):87–99.
- [63] Leo JC, Oberhettinger P, Schutz M, et al. The inverse autotransporter family: intimin, invasin and related proteins. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(2):276–282.
- [64] Mortier-Barriere I, Velten M, Dupaigne P, et al. A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell*. 2007;130(5):824–836.

Chapitre II :

Caractérisation des interactions

EHEC-NO-hôte

*Interactions entre les Escherichia coli
entérohémorragiques et le monoxyde d'azote
au cours du processus infectieux*

Contexte et synthèse de l'étude

L'enjeu majeur concernant les infections à EHEC actuellement est le manque de thérapies disponibles. En effet, l'apparition des symptômes graves, comme la diarrhée hémorragique, le SHU et le PTT, est notamment liée à la production de Stx. Or, les gènes *stx* sont portés par des phages intégrés au chromosome bactérien et leur expression est induite par la réponse SOS. Ainsi, l'utilisation d'antibiotiques, en particulier les antibiotiques inhibant la réplication de l'ADN comme les fluoroquinolones, est fortement déconseillée, puisque cela engendre une production de Stx plus importante. Par conséquent, les traitements disponibles à ce jour sont essentiellement symptomatiques et nécessitent une prise en charge clinique prolongée des patients. Le développement de nouvelles thérapies contre ces infections revêt donc un intérêt majeur en santé publique.

Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur de la réponse immune mucoale, qui pourrait avoir un rôle dans la limitation des infections à EHEC. Cette molécule a des propriétés antimicrobiennes et est impliquée dans la réponse inflammatoire. Dans l'intestin des souris en conditions pathologiques, elle est synthétisée par les cellules épithéliales, les macrophages et les neutrophiles via la NO synthase inductible (iNOS) principalement.

Par ailleurs, de précédents travaux au laboratoire ont montré, *in vitro*, que le NO inhibe les principaux facteurs de virulence des EHEC, à savoir le T3SS et Stx2. Dans les deux cas, cette inhibition est modulée par le régulateur senseur de NO, NsrR. De plus, les résultats de l'article 1 ont également mis en évidence l'induction de plusieurs gènes impliqués dans la défense contre le stress nitrosant lors de l'infection en modèle murin, suggérant un rôle important des interactions entre NO et pathogène au cours du processus infectieux. L'objectif de cette étude était donc de confirmer les résultats précédemment obtenus *in vitro*, en étudiant l'impact du NO sur les mécanismes de virulence des EHEC *in vivo* en modèle murin et ainsi évaluer le rôle protecteur potentiel du NO vis-à-vis des infections à EHEC.

La construction et l'utilisation d'une souche reportrice senseur de NO a permis d'établir que les EHEC sont capables de détecter la molécule dans la lumière intestinale. Ensuite, les souris ont subi un traitement au L-Name, un inhibiteur de NO synthase, afin de déterminer si la présence de NO au niveau intestinal pouvait influencer l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales et/ou la production de Stx. Ce traitement a engendré une augmentation du nombre d'EHEC adhérents à la muqueuse colique, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus *in vitro*. En revanche, l'inhibition de l'activité des NOS par le L-Name a eu

pour conséquence une diminution de l'activité cytotoxique des Stx dosée dans les fèces et a protégé les souris d'une atteinte rénale caractérisée par des lésions glomérulaires.

Ce travail a démontré que la production de NO au cours du processus infectieux pouvait donc être néfaste pour l'hôte, contrairement aux conclusions tirées des précédentes études *in vitro*, et montre ainsi l'importance d'étudier la pathogénicité en modèle complexe.

**Interplay between enterohemorrhagic *Escherichia coli*
and nitric oxide during the infectious process**

Ilham Naïli^{1,2,†}, Marion Gardette^{1,3,†}, Annie Garrivier¹, Julien Daniel¹, Mickaël Desvaux¹,
Mariagrazia Pizza², Alain Gobert^{1‡}, Thierry Marchal⁴, Estelle Loukiadis^{3,5}, Grégory Jubelin^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS UMR454, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² GSK, Siena, Italy

³ Université de Lyon, CNRS, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, Laboratoire
d'Ecologie Microbienne, F-63280 Marcy l'Etoile, France

⁴ VetAgro Sup, Laboratoire vétérinaire d'histopathologie, F-63280 Marcy-l'Etoile, France

⁵ VetAgro Sup, Laboratoire national de référence des *E. coli*, F-63280 Marcy-l'Etoile, France

† these authors contributed equally to this work

‡ current address: Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA

* corresponding author: Grégory Jubelin, INRA Auvergne Rhône-Alpes, UMR454 MEDIS, site
de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. Email: gregory.jubelin@inra.fr

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are bacterial pathogens responsible for life-threatening diseases in humans such as bloody diarrhea and the hemolytic and uremic syndrome. To date, no specific therapy is available and treatments remain essentially symptomatic. In recent years, we demonstrated *in vitro* that nitric oxide (NO), a major mediator of the intestinal immune response, strongly represses the synthesis of the two cardinal virulence factors in EHEC, namely Shiga toxins (Stx) and the type III secretion system, suggesting NO has a great potential to protect against EHEC infection. In this study, we investigated the interplay between NO and EHEC *in vivo* using mouse models of infection. Using a NO-sensing strain, we determined that EHEC sense NO in the gut of infected mice via the NO-sensing protein NsrR, which is essential for an efficient gut colonization by the pathogen. Treatment of infected mice with a specific NOS inhibitor increased EHEC adhesion to the colonic mucosa but unexpectedly decreased Stx activity in the gastrointestinal tract, protecting mice from renal failure. Taken together, our data indicate that NO can have both beneficial and detrimental consequences on the outcome of an EHEC infection, and underline the importance of *in vivo* studies to increase our knowledge in host-pathogen interactions.

INTRODUCTION

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), especially those belonging to the O157:H7 serotype, are foodborne pathogens responsible for intestinal disorders that may ultimately evolve to life-threatening diseases such as the hemolytic uremic syndrome (HUS) or the thrombotic thrombocytopenic purpura. To date, no specific therapy is available to fight EHEC infections in humans since antibiotics are usually not recommended. Treatments remain essentially symptomatic and most patients require prolonged clinical and follow-up outpatient care ¹. Healthcare costs associated with such disease are thus very significant ². A range of virulence factors are involved in EHEC pathogenicity ³. This includes the type III secretion system (T3SS) which enables the pathogen to attach to the intestinal epithelium and causes the formation of characteristic attaching and effacing lesions at the surface of enterocytes ⁴. The T3SS is a protein-based complex resembling a molecular syringe that allows injection of bacterial effectors into epithelial cells where they subvert specific cell signaling pathways ⁵. Among them, the protein Tir becomes inserted into the host cell membrane and acts as a receptor for the intimin protein (encoded by the *eae* gene) localized at the bacterial surface, leading to an intimate adhesion between bacteria and enterocytes. Genes encoding the T3SS are gathered into five major operons located into a pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE). In addition to the T3SS, EHEC virulence is closely associated with the production of Shiga toxins (Stx). Two antigenically distinct forms of Stx, Stx1 and Stx2, can be produced alone or in combination by EHEC strains ⁶. Epidemiological studies have shown that Stx2-producing *E. coli* strains are however more likely to cause HUS than strains producing only Stx1 ⁷. Stx-encoding genes are located in lambdoid phages integrated into the bacterial chromosome and their expression is mainly driven by activation of the SOS response in response to environmental cues ⁸. Once produced in the gut lumen, Stx translocates across the intestinal epithelium, reaches the bloodstream and targets cells expressing the receptor glycolipid globotriaosylceramide-3 (Gb3). Upon internalization and retrograde transport, Stx alters ribosomal function and induces cell necrosis or apoptosis ⁹. The kidneys and brain are the two main target organs that suffer from Stx intoxication in EHEC-infected patients, leading to the development of disease symptoms such as HUS. Since Stx diffuses via the bloodstream and can theoretically affect the vasculature of every organ, specific injuries of the kidneys and brain in HUS patients may be explained by cell-specific variations of Gb3 expression¹⁰. In the kidneys, glomerular endothelial and mesangial cells as well as tubular epithelial cells highly express Gb3 and are sensitive to Stx ^{1,11} and their intoxication contributes to the development of thrombotic microangiopathic lesions.

Intestinal pathogens, including EHEC, first have to reach and adapt to the gut environment before producing their virulence factors and causing disease. Among the harmful conditions

imposed by the gastrointestinal tract, pathogens must survive and adapt to oxidative and nitrosative stresses. These include exposure to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) liberated by mucosal immune cells in response to infection. A key component in RNS synthesis by the host is nitric oxide (NO), a highly reactive inorganic free radical. NO is produced from L-arginine by NO synthases (NOS) and particularly by the inducible NOS (iNOS) isoform under pathophysiological conditions such as an infection¹². NO can react with a large spectrum of molecules such as inorganic elements, various DNA structures, proteins and lipids, thereby carrying a strong antimicrobial activity¹³. To overcome this aggression, intestinal pathogens such as pathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter jejunii*, have developed numerous mechanisms involved in NO detoxification¹⁴. These notably include globins which oxidize NO into nitrate, and reductases which reduce NO into nitrous oxide. Inactivation of these proteins leads to mutants with higher susceptibility to NO, impaired survival within macrophages and reduced virulence capacity in their respective host¹⁵⁻¹⁹. We have previously demonstrated that subinhibitory concentrations of NO inhibit the synthesis of Stx2 by EHEC and the release of Stx2 phages via inhibition of the SOS response *in vitro*²⁰. We also have recently shown that NO represses the expression of several LEE genes and, consequently, drastically reduces EHEC adhesion to epithelial cells *in vitro*²¹. Both effects are mediated by the NO responsive regulatory protein NsrR. By repressing the production of the two major virulence factors in EHEC, combined with its typical antimicrobial effect, NO has therefore a great potential to protect against an EHEC infection. In this context, the aim of this work was to decipher the role of NO in the control of EHEC *in vivo* using mouse models of infection. First, we determined that EHEC sense NO in the gut of infected mice via the NO-sensing protein NsrR, which is essential for efficient gut colonization by the pathogen. Using a specific NOS inhibitor, we next demonstrated that host-produced NO inhibits EHEC adhesion to colonic mucosa but increases Stx toxicity in the gastrointestinal tract. We also showed that inhibition of NOS activity rescues EHEC-infected mice from developing kidney failure. Taken together, our data indicate that NO can have both beneficial and detrimental consequences in the course of an EHEC infection.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. When required, antibiotics were used at the following concentrations: 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ kanamycin; 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ampicillin; 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ chloramphenicol; 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ gentamycin; 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ streptomycin (Sm). A streptomycin resistant derivative of the prototype EHEC strain EDL933 was used throughout the study. The *nsrR* deletion was obtained by using the one-step PCR-based method²² with primers *nsrRmut-f* and *nsrRmut-R* (Table S2). Chromosomal complementation of $\Delta\textit{nsrR}$ mutant was obtained by using the mini-Tn7 method as described in Crepin *et al.*²³. Briefly, the *nsrR* coding sequence and its promoter region were amplified from EDL933 genomic DNA using primers *nsrR+prom-F* and *nsrR+prom-R* (Table S2), digested with *ApaI* and *SacI*, and inserted into the corresponding sites of pGP-Tn7-Gm. The construct was then mobilized into EDL933 Sm^R $\Delta\textit{nsrR}$ harboring pSTNSK-Cm vector (grown at 30°C) through a mating experiment. The correct clones were selected by plating on LB agar with gentamycin and chromosomal integration was verified by PCR using primers *glmS-F* and *z5225-R* (Table S2). All strains were grown in LB medium at 37°C unless otherwise indicated.

Construction of a NO-sensing EHEC reporter strain

In order to monitor NO sensing by EHEC, we constructed a reporter strain using the TnpR recombinase-based *in vivo* expression technology (RIVET)²⁴. To this end, the promoter region of gene *ytfE*, known to be highly induced by NO in *E. coli*²⁵, was amplified from genomic DNA of EDL933 using primers 2F10-F and 2F10-R (Table S2), which contain *BglIII* restriction sites in their 5' ends. The PCR product and vector pGOA1193 were digested with *BglIII* and ligated to yield plasmid p1193-*ytfE* carrying a P_{ytfE} -*tnpR* transcriptional fusion. Correct orientation of *ytfE* promoter was validated by PCR and sequencing. The plasmid was mobilized through a mating experiment into EDL-RES, an EDL933 strain harboring the RES-flanked marker cassette that contains a gene conferring kanamycin resistance and a gene conferring sucrose sensitivity²⁶. Plasmid insertion into the *ytfE* locus was verified by PCR and sequencing.

Resolution assays

To validate the ability of our reporter strain to detect NO, EDL-RES P_{ytfE} -*tnpR* strain was grown for 6 h in LB supplemented or not with increasing concentrations of NOR-4, a NO donor (Enzo Life Sciences). Expression of TnpR was monitored by calculating the percentage of bacteria that have lost the RES marker cassette. This percentage, termed resolution, is calculated for individual samples by dividing the titer obtained on LB agar plates without NaCl, with Sm and 4 % sucrose (resolved bacteria) by the titer obtained on LB agar with Sm (total bacteria).

Resolutions were also calculated from fecal samples of mice infected with EDL-RES P_{ytfE} -*tnpR* to evaluate the sensing of NO by EHEC *in vivo* during infection.

Mouse infection

All animal experiments were reviewed and approved by the Auvergne Committee for Animal Experimentation C2EA (Agreement N°7289-2016093010075533). C57BL/6 female mice 5 weeks old with SPF status were purchased from Janvier Labs (Le-Genest-St-Isle, France) and housed in cages of no more than five mice per cage. Mouse experiments were performed with 5-10 mice per group and repeated on (at least) two separate occasions. Mice were given drinking water containing 5 g/L of streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich) throughout the experiment. For some groups, drinking water was also supplemented with 1g/L of N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; Enzo Life Science) and changed daily over the course of the experiment. On day 1 following the addition of streptomycin, each mouse was infected intragastrically with 100 μl of PBS containing 10⁷ bacterial cells of EDL933 Sm^R grown in LB for 6 h. Uninfected mice were given PBS only. At indicated time points, fecal samples were collected, homogenized in PBS and subsequently diluted before plating on LB + streptomycin agar plates or Stx activity quantification. To quantify adherent bacteria to the gut mucosa, a piece of both cecum and colon were taken at day 7, cut longitudinally and washed extensively in PBS before dilution and plating. Adhesion was expressed as the ratio between adherent bacteria and the total number of EHEC detected in fecal samples at the same time point. For co-infection experiments, mice were treated with a mix containing 10⁷ each of EDL933 Sm^R and EDL933 Δ *nsrR* strains. Following plating of fecal samples on LB agar plates supplemented with streptomycin or with streptomycin + kanamycin, competitive indices were obtained by dividing the output ratio by the input ratio (WT / Δ *nsrR*). For the lethal infection model, mice also received an intraperitoneal dose of 40 μg of ciprofloxacin (prepared in 500 μl PBS) 1, 2 and 3 days post-infection (DPI) (adapted from²⁷). Body weight and clinical signs of mice were monitored daily to evaluate the severity of infection. Mice presenting a weight loss > 15% compared to body weight at day 0, or presenting severe clinical symptoms such as ataxia and/or lethargy, were immediately euthanized. Urine was collected daily for determination of the specific gravity using a refractometer, as well as urea concentration using the QuantiChrom Urea assay kit (BioAssay Systems)

Histological analyses

Kidneys were excised from euthanized mice at 7 DPI and were immediately fixed in PBS + formol 4% (Neutral Buffered Formalin, Diapath) during 48 h before being embedded in paraffin. Tissue sections were stained with haematoxylin and eosin. The section were

examined for glomerular, tubular, interstitial and vascular changes by light microscopy. Images were acquired and analyzed using Caseviewer software.

Quantification of Stx activity

The Stx activity from different samples was monitored using the Vero-d2EGFP cell line²⁸. The cell line was maintained and propagated routinely at 37 °C with 5% CO₂ under humidified conditions in a complete medium made of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), Zell Shield (Minerva Biolabs) and 200 µg.ml⁻¹ Geneticin (Gibco). For the assays, Vero-d2EGFP cells were seeded in black 96-well plates with clear bottoms at 3.10⁴ cells per well and incubated for 3 days to reach 80-90 % confluence. Samples to be tested as well as purified Stx2 (Toxin Technology) used as an internal standard were two-fold diluted in complete medium, then transferred to Vero-d2EGFP-containing plates. After a 16 h incubation period in a CO₂ incubator, samples were removed and 100 µl of PBS was added to each well before GFP quantification in a Spark microplate reader (Tecan) with excitation at 485 ± 20 nm and emission at 530 ± 20 nm. Stx activity was expressed as an arbitrary unit by comparing fluorescence values from samples with the standard curve obtained with purified Stx2.

Statistical analyses

All statistics were made using the GraphPad Prism software version 8 (San Diego, California). Unpaired two-tailed student's *t* tests were used to determine significant differences between two groups. ANOVA with the Holm-Sidak correction or Dunn's comparisons tests were used to analyze differences among multiple groups. The Log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival curves. Statistical tests used for each data analysis are indicated in figure legends. *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

EHEC sense NO in the gut of infected mice

Before investigating the role of NO in the control of EHEC infection, we first wanted to evaluate whether EHEC are able to sense NO in the gut of infected mice. To this end, we constructed an EHEC EDL933 strain that reports the detection of NO using elements from the RIVET system²⁴, a RES cassette containing two selective markers, and the reporter gene *tnpR*, which encodes a recombinase that specifically cleaves the marker cassette (Fig. 1A and see M&M). The reporter gene was placed under the control of the promoter region of gene *ytfE*, whose expression is known to be highly upregulated in the presence of NO through the release of repressing activity from NsrR, a major NO-sensing regulatory protein in *E. coli*^{25, 29}. To validate the efficiency of our reporter strain to detect NO, the strain was grown in LB with various concentrations of NOR-4, a NO donor (Fig. 1B). As expected, the resolution (i.e. the percentage of bacteria that have lost the RES cassette) from a bacterial culture without NOR-4 was very low, indicating that the P_{ytfE} -*tnpR* fusion was not expressed in the absence of NO. In contrast, the addition of increasing concentrations of NOR-4 led to a strong increase in resolution, reaching more than 80 % with 500 μ M of NOR-4 (Fig. 1B). This data demonstrates that our reporter strain efficiently detects the presence of NO in the surrounding environment. Next, we infected mice with this reporter strain and monitored the resolution status of EHEC recovered from feces of animals over time. As shown in Figure 1C, the resolution was low at the beginning of infection, increased gradually between 1 and 3 days post-infection (DPI) and remained stable until the end of experiment. As a control, we also infected mice treated with L-NAME, a specific inhibitor of NO synthase (NOS) activity. The resolution level did not increase over time and was significantly different from the resolution obtained with untreated mice since day 1. This result clearly indicates that EDL933 detects host-produced NO in the gut during mouse infection.

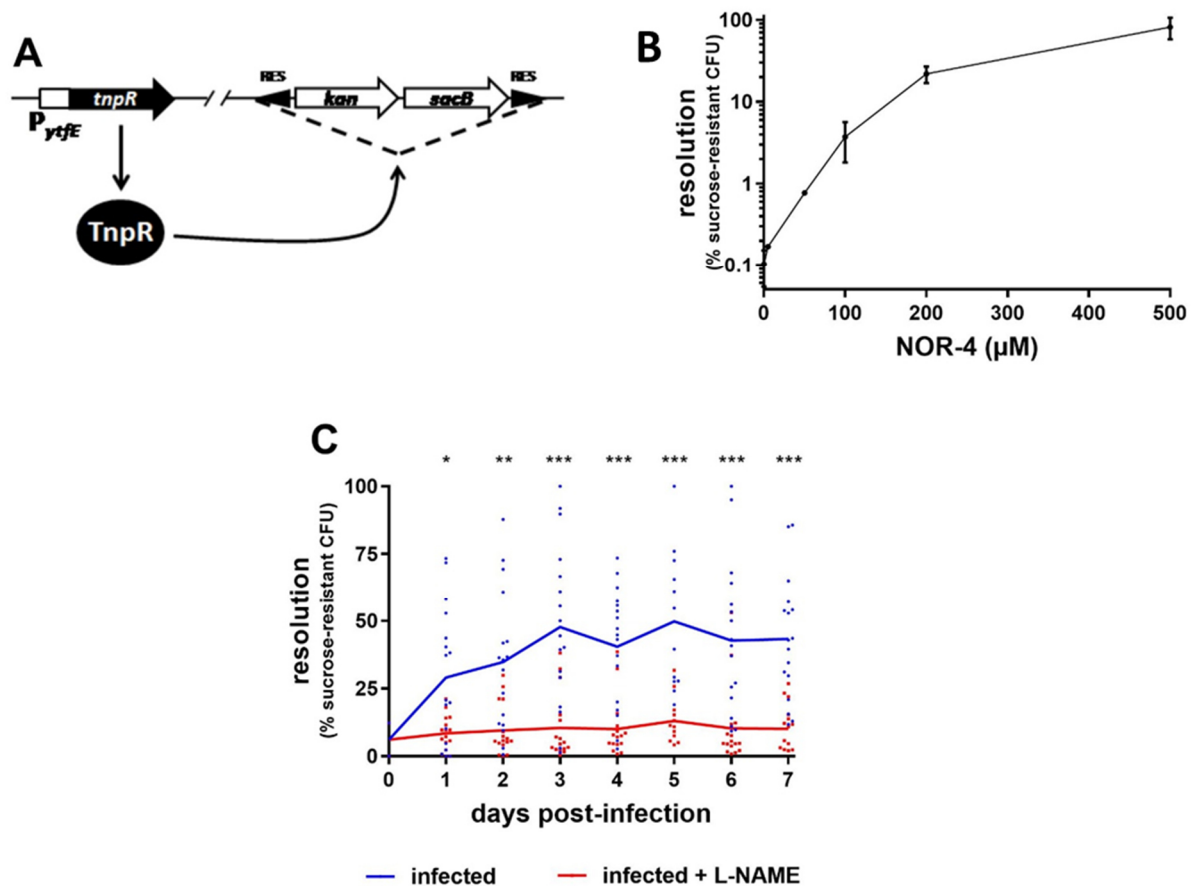


Figure 1. EHEC sense NO in the gut of infected mice. (A) Schematic representation of the NO-sensing reporter system. The EHEC EDL933 strain carries a RES-flanked marker cassette and a P_{ytfE} - $tnpR$ transcriptional fusion. In the presence of NO, P_{ytfE} is activated, leading to the expression of TnpR recombinase and excision of the cassette. The strain becomes kanamycin-sensitive and sucrose-resistant. **(B)** The NO reporter strain was grown for 6 h in LB supplemented with various concentrations of NOR-4. Resolutions (percentage of bacteria that have lost the RES marker cassette) were calculated following bacterial numeration on plates with or without sucrose. Values represent the mean +/- standard deviation. **(C)** Mice, treated or not with the NOS inhibitor L-NAME, were infected with the EHEC NO reporter strain. At the indicated time points, resolutions were calculated from fecal samples. Each dot represents one mouse and curves represent mean values. A two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups. ns: non-significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

We next examined whether the NO-sensing protein NsrR plays a role in EHEC fitness during mouse infection. Mice were co-infected with an equal ratio of wild-type (WT) and $\Delta nsrR$ strains of EDL933, and both populations were monitored over the course of infection. As shown in Figure 2A, the WT strain was detected in significantly higher concentrations than the $\Delta nsrR$ strain in feces between 3 and 8 DPI. Determination of the competitive index for individual animals confirmed that the WT strain outcompetes the $\Delta nsrR$ mutant *in vivo* (Fig.

2B). This competitive advantage was specific to *nsrR* as shown by a competition assay between $\Delta nsrR$ and a $\Delta nsrR$ complemented strain (Fig. S1). Taken together, these data demonstrate that EHEC detect NO in the gut of infected mice and that the NO-sensing transcription factor NsrR is required for the pathogen to efficiently colonize the mouse gut.

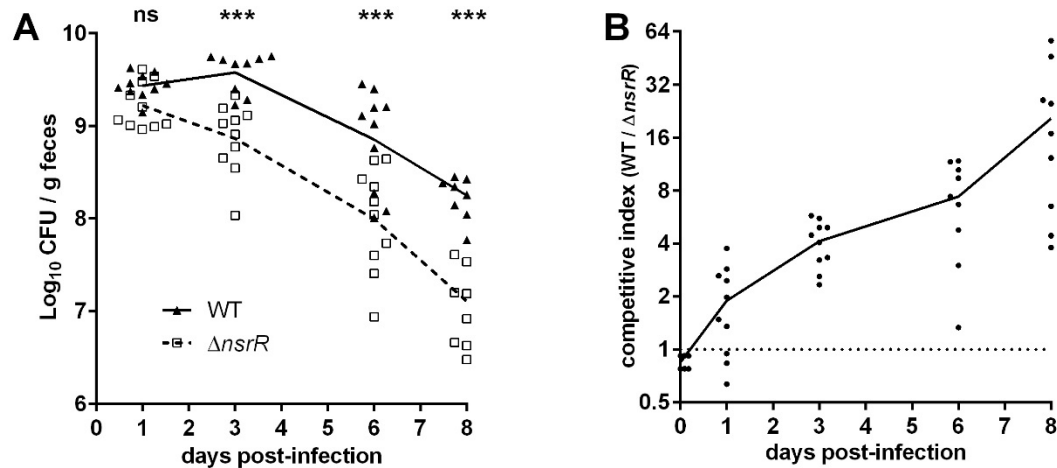


Figure 2. NsrR is required for an efficient colonization of the mouse gut by EDL933. Mice were co-infected at a 1:1 ratio with wild-type (WT) and $\Delta nsrR$ EDL933 strains. At the indicated time points, concentrations of each strain in feces (A) and corresponding competitive indices (B) were determined by plating samples on LB plates with specific antibiotic. Each dot represents one mouse and curves or lines represent mean values. A multiple two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups each day. ns: non-significant; *** P<0.001.

NO limits EHEC adhesion to the colonic mucosa

We have previously shown that NO inhibits EHEC adhesion to epithelial cells *in vitro*²¹. To assess whether NO affects the ability of EHEC to adhere to the gut epithelium *in vivo*, mice treated or not with L-NAME were infected with EDL933. As previously observed³⁰, EHEC infection of streptomycin-treated mice allows for a stable establishment of the pathogen within the gastrointestinal tract without weight loss or development of clinical symptoms. Addition of L-NAME in the drinking water of animals affected neither these parameters nor the excretion level of EDL933 in feces (Fig. 3A and data not shown). No difference was observed between the two groups in terms of bacterial adherence to the cecal tissue at 7 DPI (Fig. 3B). In contrast, the proportion of EHEC adherent to the colon was significantly increased by a factor 7 in mice treated with L-NAME (Fig. 3C). These data demonstrate that inhibition of NOS activity in infected mice favors EHEC adherence to the colonic epithelium.

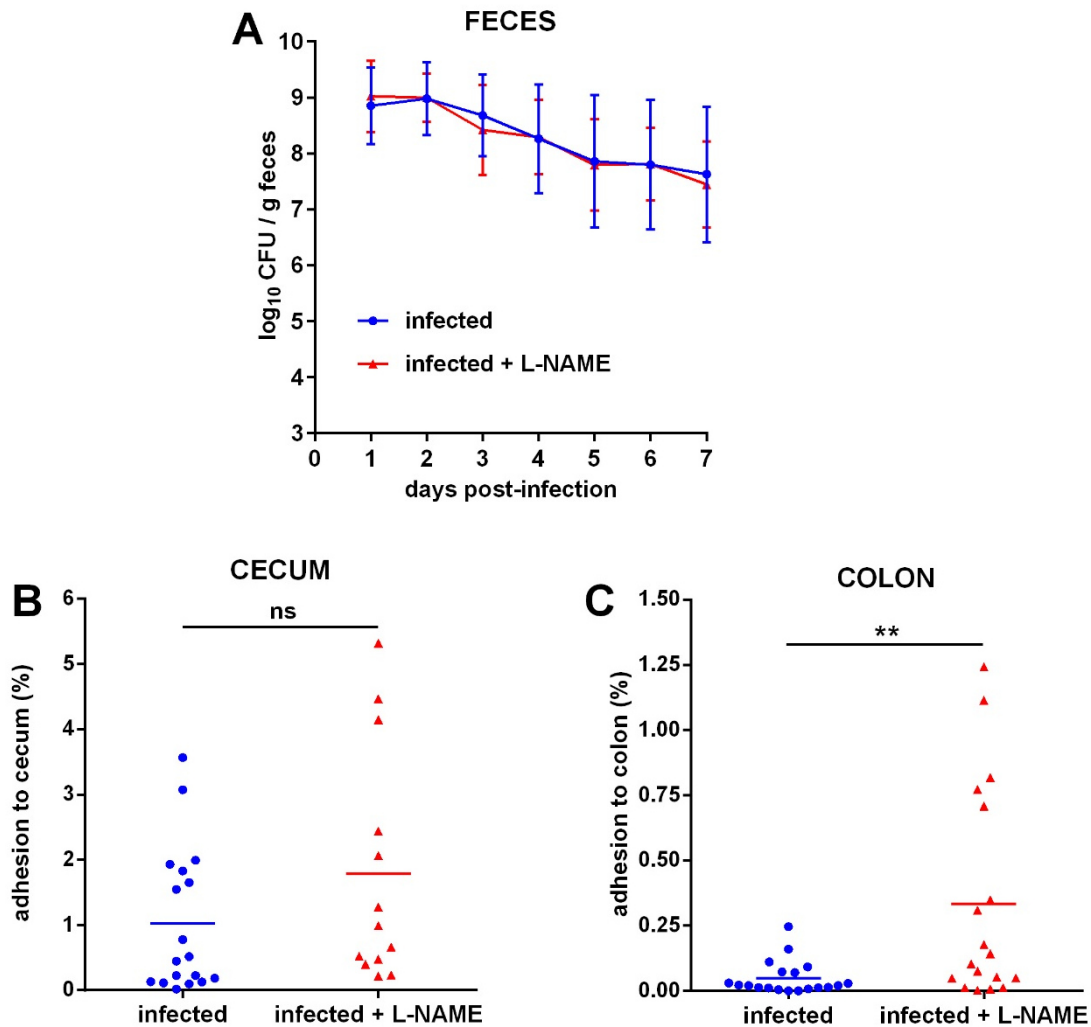


Figure 3. L-NAME treatment of infected mice increases EHEC adhesion to the colonic mucosa. Mice, treated or not with L-NAME, were infected with EDL933. **(A)** At the indicated time points, EHEC shedding was quantified by plating fecal samples on LB plates with Sm. Values represent mean +/- standard deviation. Mice were euthanized at 7 DPI and cecum **(B)** and colon **(C)** were harvested, washed in PBS, crushed and then plated on LB plates with Sm in order to quantify mucosa-associated EHEC. Data are represented as the percentage of adherent bacteria relative to the total number of EHEC quantified in fecal samples. Each dot represents one mouse and means are indicated as a line. A two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups. ns: non-significant; ** P<0.01.

***NO* enhances Stx toxicity in the gut lumen**

Previous work from our laboratory has determined that NO also inhibits the production of Stx2 during *in vitro* growth of EDL933²⁰. We therefore investigated whether mouse treatment with L-NAME affects the level of Stx activity in the gut of EDL933-infected mice. Following infection, fecal samples were collected daily and Stx activity was quantified using Vero-

d2EGFP, a Stx-sensitive cell line harboring a destabilized variant of GFP used to monitor protein synthesis inhibition²⁸. Unexpectedly, Stx activity was significantly lower in feces of infected mice treated with L-NAME versus untreated mice (Fig. 4). Indeed, the toxin activity was reduced between 1 and 5 DPI with a decrease fold change ranging from 2 to 6 compared to untreated mice. No Stx activity was detected in urine (day 6) or serum (day 7) of infected mice from either group (data not shown). These data indicate that NO produced by the host during infection increases Stx activity.

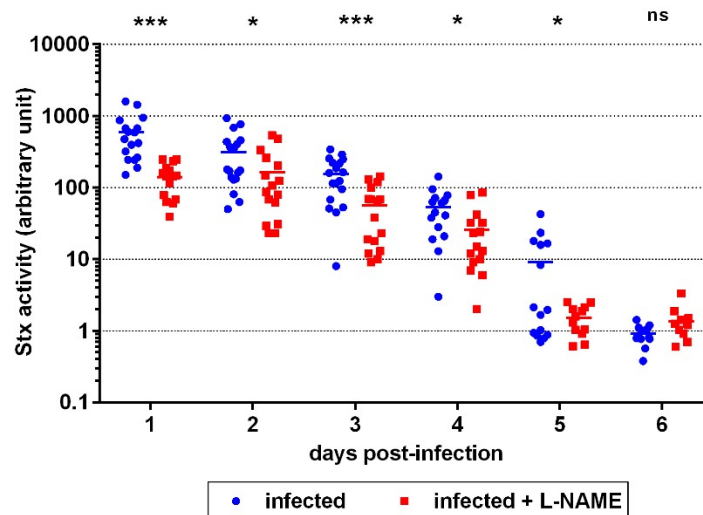


Figure 4. L-NAME treatment of infected mice limits Stx toxicity in the gut. Mice, treated or not with L-NAME, were infected with EDL933. At the indicated time points, Stx activity from feces was quantified using the Vero-d2EGFP cell line. Each dot represents one mouse and means are indicated as a line. A multiple two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups every day. ns: non-significant; * P<0.05; *** P<0.001.

NO exacerbates renal failure following a lethal EHEC challenge

We next investigated the role of NO in a lethal EHEC infection model. Following infection of mice treated or not with L-NAME, intraperitoneal injections of ciprofloxacin were performed in order to boost Stx production (see M&M). As a consequence of Stx prophage lytic cycle induction, ciprofloxacin treatment led to a massive decrease of EDL933 in feces as well as a high level of toxin produced as determined by the measurement of Stx activity from feces (Fig. 5A and compare Fig. 4 and 5B). When compared to control mice, mice infected with EDL933 significantly lost weight, developed clinical signs of illness and were eventually euthanized (Fig. 5C and 5D). As expected, the development of disease symptoms was strongly correlated with Stx activity level since mice presenting the highest Stx activity levels were the ones that needed to be euthanized (Fig. 5B, open symbols). Addition of L-NAME to the drinking water

of animals did not significantly alter the survival rate and weight loss of infected mice or the Stx activity calculated from feces (Fig. 5B-D).

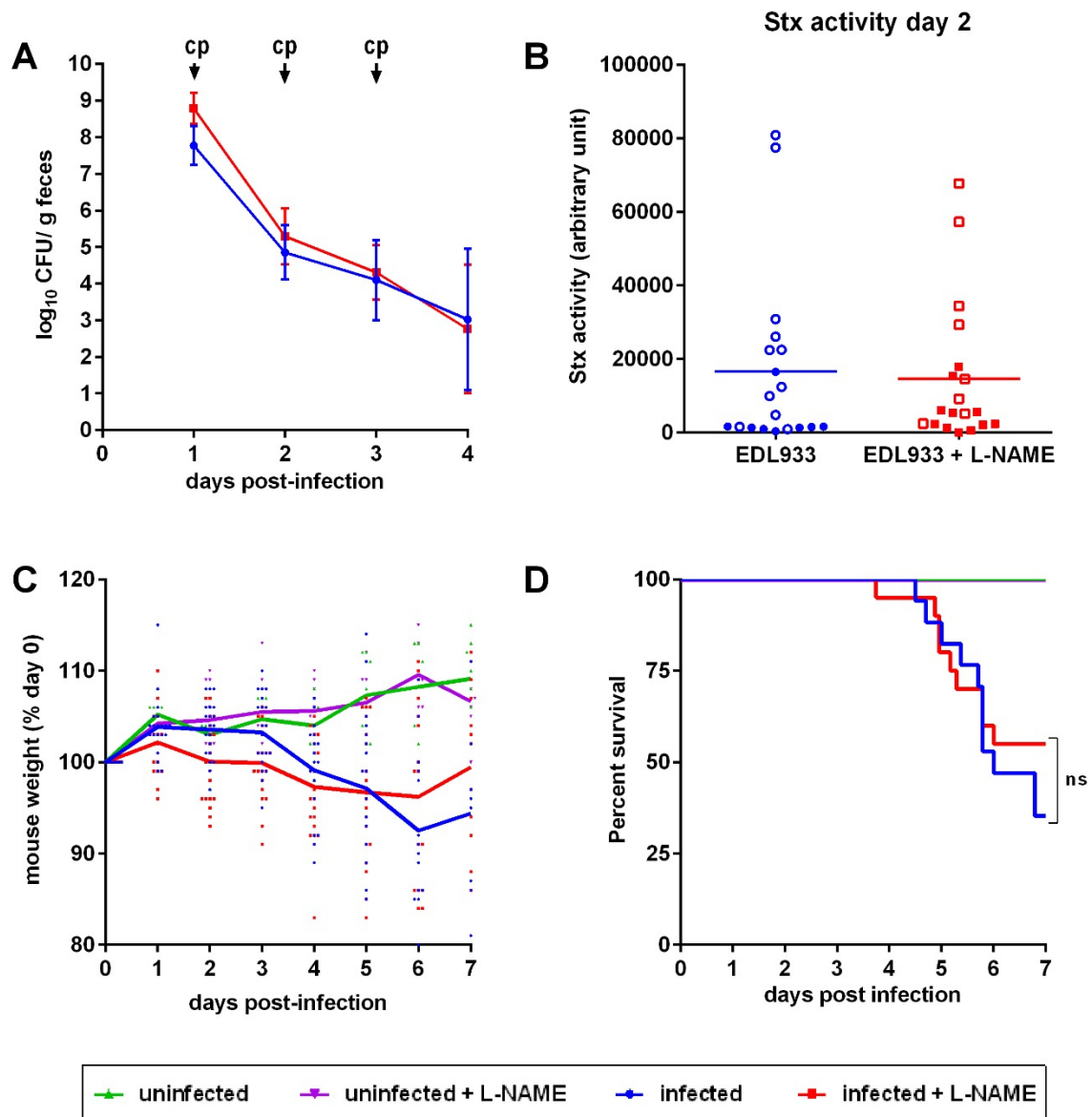


Figure 5. Role of NO in a lethal EHEC infection model. Mice, treated or not with L-NAME, were left uninfected or were infected with EDL933. Each mouse was injected 40 μ g of ciprofloxacin (cp) intraperitoneally at 1, 2 and 3 DPI to induce Stx production and release. **(A)** At the indicated time points, EHEC shedding was quantified by plating fecal samples on LB plates with Sm. Values represent the mean \pm standard deviation. **(B)** Stx activity from feces was quantified at 2 DPI using Vero-d2EGFP cells. Each dot represents one mouse and means are indicated as a line. Open and closed symbols indicate mice that were euthanized or alive at 7 DPI, respectively. **(C)** Mouse weights were recorded every day post-infection and weight curves are presented as the percentage relative to the recorded weight at the day of infection (day 0). Each dot represents one mouse and curves represent mean values. **(D)** The survival time and rate were recorded for 7 days after infection, and statistics were obtained using a Log-rank (Mantel-Cox) test (n= 20 per group).

We also measured the urine specific gravity (USG) of each mouse daily in order to reveal potential kidney dysfunctions^{31, 32}. Whereas the USG was stable overtime for control mice, the USG decreased for EDL933-infected mice, starting from 3 DPI (Fig. 6). Interestingly, the USG did not change for infected mice treated with L-NAME and values were significantly different compared to those from untreated infected mice between 4 and 7 DPI (Fig. 6). Moreover, low USG values recorded from infected mice were correlated with a decrease of urea concentration in urine (Fig S2), suggesting an alteration of renal function in these animals.

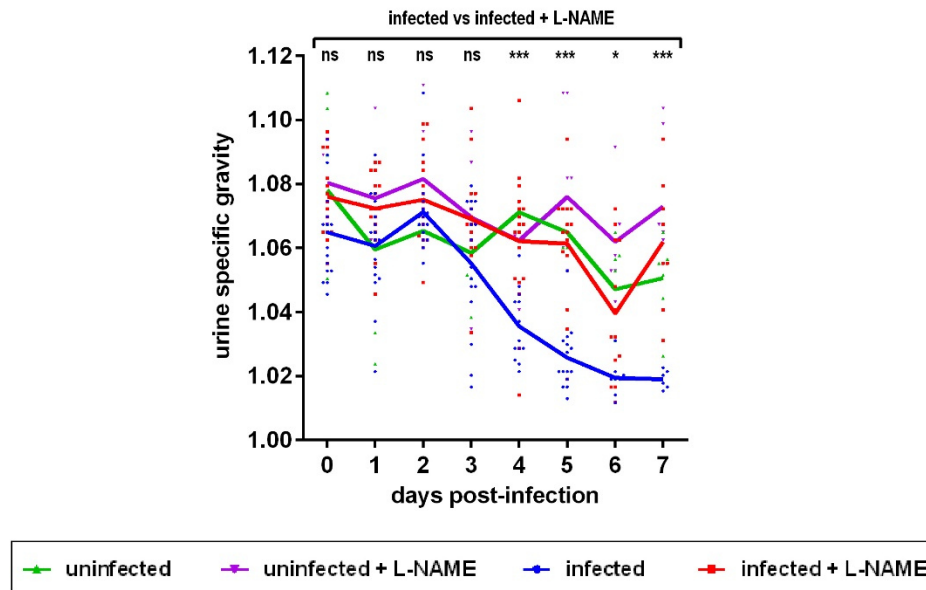


Figure 6. Influence of EHEC infection and L-NAME treatment on the urine specific gravity of mice. Mice, treated or not with L-NAME, were left uninfected or were infected with EDL933 and injections of ciprofloxacin were performed at 1, 2 and 3 DPI. At the indicated time points, urine was collected from each animal and the urine specific gravity was measured using a refractometer. Each dot represents one mouse and curves represent mean values. An ANOVA with the Holm-Sidak test was applied to compare all groups each day. ns: non-significant; * P<0.05; *** P<0.001.

We also examined renal tissues of mice and noticed significant structural changes, particularly in the renal corpuscles, which are units of blood filtration in kidneys. First, several Bowman’s capsules appeared of reduced size, and sometimes were even invisible in infected mice (Fig. 7). In addition, the glomeruli appeared smaller in this group of mice when compared to uninfected mice and this was confirmed by a quantitative analysis (Fig. 8A). We also analyzed the structure of kidneys in mice treated with L-NAME. Treatment of uninfected mice with L-NAME did not alter the overall structure of kidneys. However, the surface of glomeruli was increased in infected mice treated with L-NAME versus infected mice (Fig. 7 and 8A), suggesting that the consequence of infection on kidney structure is not similar when mice are

treated or not with the NOS inhibitor. We also noticed a significant change in the number of mesangial cells, which affect glomerular filtration rate through their contractile activity, within the glomeruli. Indeed, we observed significantly more mesangial cells per μm^2 of glomerulus in infected mice compared to the other groups, including infected mice treated with L-NAME (Fig. 8B). The structural alterations of renal corpuscles combined with the decrease of urea in urine of infected mice (Fig S2) strongly indicate that EDL933-infected mice developed a renal failure. Moreover, we observed that inhibition of NOS activity by L-NAME protects infected mice from renal damages.

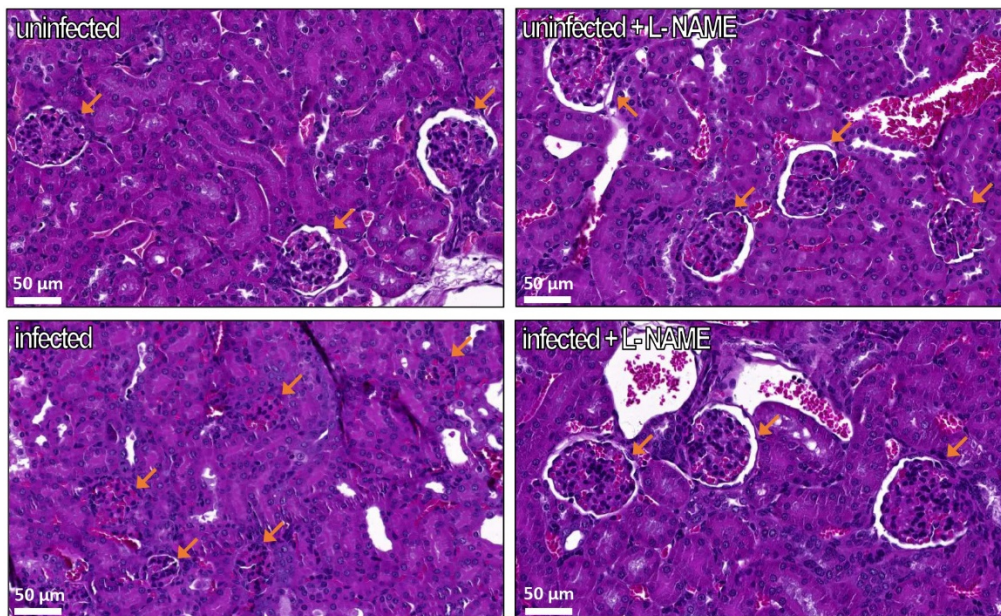


Figure 7. Influence of EHEC infection and L-NAME treatment on kidney structure. Mice, treated or not with L-NAME, were left uninfected or were infected with EDL933. Injections of ciprofloxacin were performed at 1, 2 and 3 DPI and mice were euthanized at 7 DPI. Kidneys were immediately harvested and organ sections were stained with hematoxylin and eosin. Representative images of the kidney of one mouse from each group are shown. Orange arrows show renal corpuscles which are constituted of a glomerulus surrounded by the Bowman's capsule.

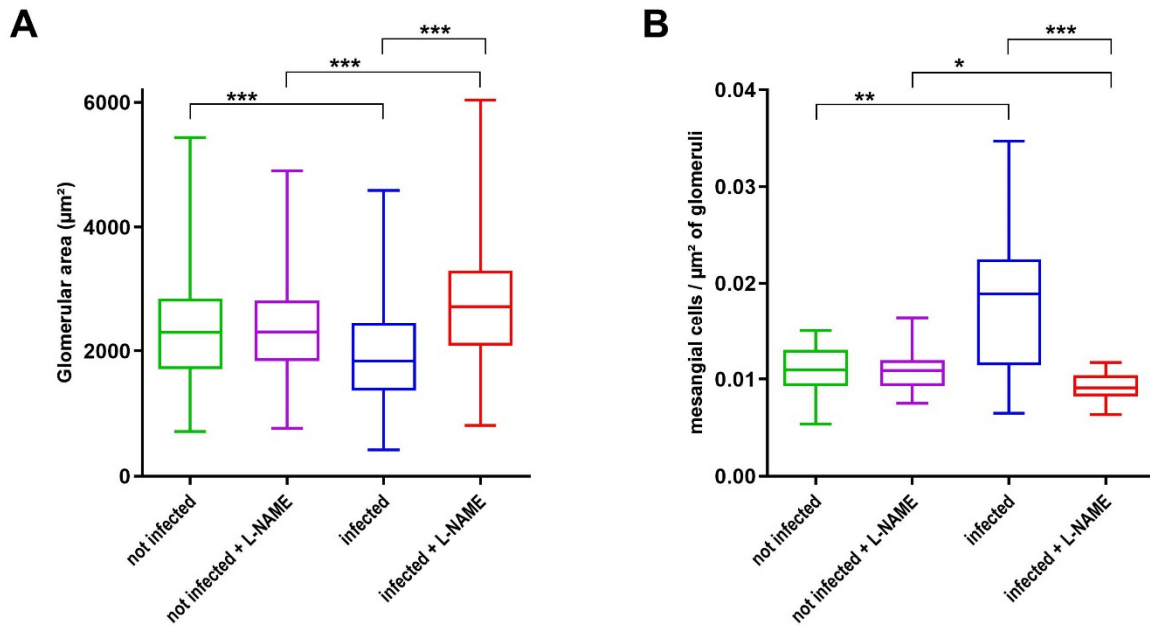


Figure 8. Influence of EHEC infection and L-NAME treatment on the size of glomeruli and concentration of mesangial cells within glomeruli. Mice, treated or not with L-NAME, were left uninfected or were infected with EDL933. Injections of ciprofloxacin were performed at 1, 2 and 3 DPI and mice were euthanized at 7 DPI. Kidneys were immediately sampled and organ sections were stained with hematoxylin and eosin. **(A)** The surface of each glomerulus observed in a kidney section was quantified from at least 2 mice of indicated groups (number of analyzed glomeruli > 370 for each group). **(B)** The concentration of mesangial cells within glomeruli was calculated from at least 2 mice of indicated groups. Thirty glomeruli were arbitrarily selected from kidney sections and the number of mesangial cells was divided by surface of the glomerulus. Data are presented as a box & whisker plot. A Kruskal-Wallis test was applied to compare all groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

During the past decades, NO has been recognized as an important player of the immune system, notably via its contribution to host defense against infectious agents¹². Indeed, NO exerts a potent antimicrobial activity against many bacteria, viruses, fungi and parasites^{13, 33-35}. NO also alters the synthesis level of virulence factors in some pathogens through inactivation of virulence-associated transcription factors, especially iron-containing proteins³⁶. In EHEC, we have demonstrated *in vitro* that NO inhibits the synthesis of two critical virulence factors, Stx2 and T3SS, via the NO-sensing regulator NsrR^{20, 21}. Expression of others virulence determinants is probably also affected by NO since they are controlled by regulatory circuits that can be disturbed following NO exposure³⁷⁻³⁹. The aim of this study was to evaluate the potential role of NO in the control of an EHEC infection. We first determined that EHEC sense NO in the mouse gut as early as the first day of infection using an *in vivo* reporter system based on the expression of NsrR-dependent gene *ytfE*. To our knowledge, this is the first time that detection of NO by an intestinal extracellular pathogen has been directly demonstrated. We also showed that the NO-sensing regulator NsrR is essential for an efficient fitness of EHEC in the gastrointestinal tract. Taken together with previous works demonstrating that several NO-regulated genes are up-regulated during infection^{26, 40}, these data argue that NO sensing by EHEC is probably a critical step in the infectious process.

The physiological consequences of NOS inhibition in EHEC-infected mice was then evaluated on different levels. While no difference was observed in bacterial shedding, the proportion of mucosa-adherent EHEC was significantly increased in the colon of mice treated with L-NAME at 7 DPI. This anti-adhesion property of NO is in accordance with our previous study which determined that chemical or cellular sources of NO inhibits EHEC adhesion to intestinal epithelial cells grown *in vitro*²¹. In addition, NO seems to have general anti-bacterial adhesion properties as determined by its efficiency to limit adhesion of several Gram-positive and Gram-negative bacteria to abiotic surfaces⁴¹. We also quantified the impact of NOS inhibition on Stx production in the gut of infected mice. Until day 5, mouse treatment with L-NAME led to a significant decrease of Stx cytotoxic activity recorded from fecal samples. These results were unexpected since our team demonstrated that NO inhibits Stx2 synthesis during standard *in vitro* growth conditions²⁰. However, a recent study demonstrated that NO enhances the production of Stx1 and Stx2 in EHEC grown under *in vitro* anaerobic conditions in a RecA-and Fur-dependent way⁴². Because the gastrointestinal tract is an anaerobic milieu, it may thus imply that NO would increase the synthesis of Stx1 and Stx2 in the gut of infected mice, and explain why we observed an inhibition of Stx toxicity following L-NAME treatment.

To define the potential role of NO in EHEC-associated symptoms, we used a lethal model of infection consisting of ciprofloxacin injections to EHEC-infected mice in order to boost Stx

phage induction and toxin release. In this model, the renal function was seriously affected in EHEC-infected mice, as determined by USG values and histological damages observed in kidney. Interestingly, L-NAME treatment prevented renal failure in infected mice, suggesting that NO production in response to infection can be detrimental to the host. As observed in the non-lethal mouse model of infection, NO might have increased Stx synthesis in the gut to levels sufficient to provoke a renal failure. However, we were not able to reproduce this statement at a significant level in infected-mice treated with ciprofloxacin, probably as a result of heterogeneous animal response to antibiotic injections. Another possible explanation could be linked to a better translocation of Stx across the gut mucosa in the presence of NO. Indeed, it has been reported that NO contributes to an intestinal barrier dysfunction in rodents via an increase of intestinal permeability^{43, 44}. Because NO has pleiotropic effects in the organism, we also cannot exclude the hypothesis that NO worsens the alteration of renal function in the presence of Stx. NO is a well-known player acting on blood pressure as well as on renal excretory functions. In particular, inhibition of NO synthesis has been shown to decrease renal blood flow^{45, 46} and this may limit the amount of Stx effectively reaching the kidneys.

Altogether, our results demonstrate that the production of NO in response to EHEC infection can be detrimental to the host, in particular to the renal function. Despite the protective properties attributed to NO against many infectious agents from *in vitro* studies, the effect of NO in controlling pathogens *in vivo* seems far more complex, as exemplified by our study. While an iNOS-dependent production of NO has been shown to protect mice from several pathogens such as *Listeria monocytogenes* or *Leishmania major*^{47, 48}, iNOS expression has no discernible protective effect and can even worsen the disease symptoms for other infectious agents. In *Salmonella* infections, the iNOS gene expression is highly induced in tissue of infected mice⁴⁹ but the NO subsequently produced appears to have contradictory effects. Whereas NO limits the colonization of Peyer's patches by the pathogen as well as its replication in the spleen and liver^{50, 51}, NO and the ensuing proinflammatory cascade also promote the fitness of *Salmonella* and allow the pathogen to outcompete the intestinal microbiota^{52, 53}. In neonatal meningitis caused by *E. coli*, iNOS-dependent NO has serious detrimental impact on the outcome of infection, since it promotes development of bacteremia as well as disruption of the blood-brain barrier^{54, 55}. As in the case of *E. coli*-associated meningitis, our study showed that production of NO by the host may exacerbate the severity of symptoms caused by an EHEC infection. This work pushes forward an essential role of NO-EHEC interplay in the outcome of an infection and may assist future works to evaluate the efficiency of novel therapeutic strategies based on the modulation of NO concentration either by synthesis, delivery or scavenging.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr K. Teter (University of Florida) for his generous gift of the Vero-d2EGFP cell line. This work was supported in part by the EU FP7 Marie Curie Actions ITN EID DISCo program FP7-PEOPLE-607611 and by fundings from INRA and VetAgro Sup institutes. Ilham Naili was a Marie Curie PhD Research Fellow funded under the DISCo program and Marion Gardette was a PhD Research Fellow funded by INRA and VetAgro Sup institutes.

REFERENCES

1. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1073-86.
2. Frenzen PD, Drake A, Angulo FJ. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J Food Prot* 2005; 68:2623-30.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology* 2004; 2:123-40.
4. McDaniel TK, Jarvis KG, Sonnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:1664-8.
5. Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 2011; 80:1420-38.
6. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2014; 2:EHEC-0024-2013.
7. Siegler RL, Obrig TG, Pysher TJ, Tesh VL, Denkers ND, Taylor FB. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003; 18:92-6.
8. Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 2004; 294:115-21.
9. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:450-79.
10. Hughes AK, Ergonul Z, Stricklett PK, Kohan DE. Molecular basis for high renal cell sensitivity to the cytotoxic effects of shigatoxin-1: upregulation of globotriaosylceramide expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2002; 13:2239-45.
11. Trachtman H, Austin C, Lewinski M, Stahl RA. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nature reviews Nephrology* 2012; 8:658-69.
12. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2:907-16.
13. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* 2012; 3:271-9.
14. Flint A, Butcher J, Stintzi A. Stress Responses, Adaptation, and Virulence of Bacterial Pathogens During Host Gastrointestinal Colonization. *Microbiol Spectr* 2016; 4.
15. Stevanin TM, Moir JW, Read RC. Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect Immun* 2005; 73:3322-9.
16. Arai H, Iiyama K. Role of nitric oxide-detoxifying enzymes in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* against the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2013; 77:198-200.
17. Kakishima K, Shiratsuchi A, Taoka A, Nakanishi Y, Fukumori Y. Participation of nitric oxide reductase in survival of *Pseudomonas aeruginosa* in LPS-activated macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; 355:587-91.

18. Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol Microbiol* 2012; 85:492-512.
19. Stevanin TM, Poole RK, Demoncheaux EA, Read RC. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect Immun* 2002; 70:4399-405.
20. Vareille M, de Sablet T, Hindre T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:10199-204.
21. Branchu P, Matrat S, Vareille M, Garrivier A, Durand A, Crepin S, et al. NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1003874.
22. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6640-5.
23. Crepin S, Harel J, Dozois CM. Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:6001-8.
24. Osorio CG, Crawford JA, Michalski J, Martinez-Wilson H, Kaper JB, Camilli A. Second-generation recombination-based *in vivo* expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine. *Infect Immun* 2005; 73:972-80.
25. Justino MC, Vicente JB, Teixeira M, Saraiva LM. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J Biol Chem* 2005; 280:2636-43.
26. Gardette M, Le Hello S, Mariani-Kurkdjian P, Fabre L, Gravey F, Garrivier A, et al. Identification and prevalence of *in vivo*-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Virulence* 2019; 10:180-93.
27. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* 2000; 181:664-70.
28. Quinones B, Massey S, Friedman M, Swimley MS, Teter K. Novel cell-based method to detect Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 and inhibitors of toxin activity. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:1410-6.
29. Bodenmiller DM, Spiro S. The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 2006; 188:874-81.
30. Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 1990; 58:2438-45.
31. Eaton KA, Friedman DI, Francis GJ, Tyler JS, Young VB, Haeger J, et al. Pathogenesis of renal disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germ-free mice. *Infect Immun* 2008; 76:3054-63.
32. Tyler JS, Beerli K, Reynolds JL, Alteri CJ, Skinner KG, Friedman JH, et al. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003236.

33. De Groote MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. Clin Infect Dis 1995; 21 Suppl 2:S162-5.
34. Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J Clin Invest 1997; 99:2818-25.
35. Jones ML, Ganopolsky JG, Labbe A, Wahl C, Prakash S. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 88:401-7.
36. Green J, Rolfe MD, Smith LJ. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. Virulence 2014; 5:794-809.
37. Spiro S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. FEMS Microbiol Rev 2007; 31:193-211.
38. Yang B, Feng L, Wang F, Wang L. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection. Nat Commun 2015; 6:6592.
39. Wan B, Zhang Q, Ni J, Li S, Wen D, Li J, et al. Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). PLoS Pathog 2017; 13:e1006246.
40. John M, Kudva IT, Griffin RW, Dodson AW, McManus B, Krastins B, et al. Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. Infect Immun 2005; 73:2665-79.
41. Nichols SP, Schoenfisch MH. Nitric oxide-flux dependent bacterial adhesion and viability at fibrinogen-coated surfaces. Biomater Sci 2013; 1.
42. Ichimura K, Shimizu T, Matsumoto A, Hirai S, Yokoyama E, Takeuchi H, et al. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. Microbiologyopen 2017; 6.
43. Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. Gastroenterology 1997; 113:1246-57.
44. Quirino IE, Cardoso VN, Santos R, Evangelista WP, Arantes RM, Fiuza JA, et al. The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2013; 37:392-400.
45. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Am J Kidney Dis 1994; 24:112-29.
46. Jover B, Mimran A. Nitric oxide inhibition and renal alterations. J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38 Suppl 2:S65-70.
47. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell 1995; 81:641-50.
48. Blos M, Schleicher U, Soares Rocha FJ, Meissner U, Rollinghoff M, Bogdan C. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania* major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. Eur J Immunol 2003; 33:1224-34.

49. Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, et al. Induction of nitric oxide synthase and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65:2932-40.
50. Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival *in vivo*. *J Exp Med* 2000; 192:237-48.
51. Alam MS, Zaki MH, Sawa T, Islam S, Ahmed KA, Fujii S, et al. Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits antiapoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. *Microbiol Immunol* 2008; 52:197-208.
52. Henard CA, Vazquez-Torres A. Nitric oxide and *Salmonella* pathogenesis. *Front Microbiol* 2011; 2:84.
53. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5:2177-89.
54. Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis* 2001; 183:1749-59.
55. Mittal R, Gonzalez-Gomez I, Goth KA, Prasadarao NV. Inhibition of inducible nitric oxide controls pathogen load and brain damage by enhancing phagocytosis of *Escherichia coli* K1 in neonatal meningitis. *Am J Pathol* 2010; 176:1292-305.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES

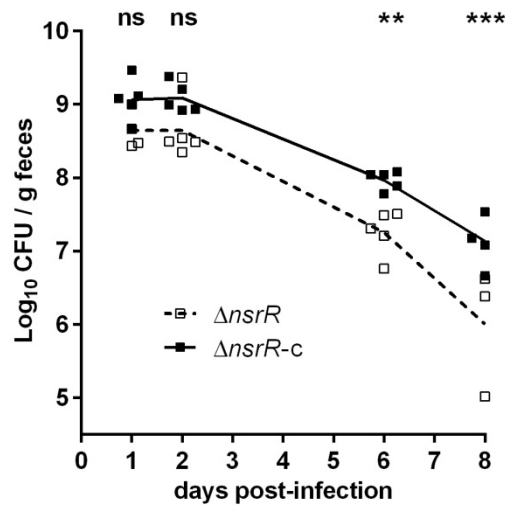
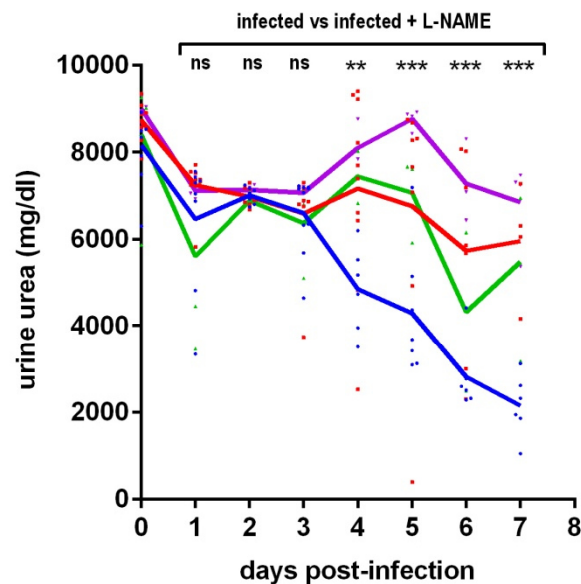


Figure S1: Mice were co-infected at a 1:1 ratio with $\Delta nsrR$ and $\Delta nsrR-c$ EDL933 strains. At the indicated time points, concentrations of each strain in feces were determined by plating samples on LB plates with specific antibiotics. Each dot represents one mouse and curves represent mean values. A multiple two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups each day. ns: non-significant; ** P<0.01; *** P<0.001.



—●— uninfected
 —●— uninfected + L-NAME
 —●— infected
 —●— infected + L-NAME

Figure S2: Mice, treated or not with L-NAME, were left uninfected or were infected with EDL933. At the indicated time points, urine was collected from each animal and urine urea was quantified. Each dot represents one mouse and curves represent mean values. An ANOVA with the Holm-Sidak test was applied to compare all groups each day. ns: non-significant; ** P<0.01; *** P<0.001.

Table S1: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description	Source or reference
Strains		
EDL933 Sm ^R	Streptomycin-resistant derivative of EDL933	26
EDL933 Δ <i>nsrR</i>	EDL933 Sm ^R Δ <i>nsrR</i> , Sm ^R , Kan ^R	This study
EDL933 Δ <i>nsrR-c</i>	EDL Sm ^R Δ <i>nsrR attTn7::nsrR</i> , Sm ^R , Kan ^R , Gm ^R	This study
EDL-RES	EDL933-Sm ^R containing <i>res-kan-sacB-res</i> cassette, Sm ^R , Kan ^R , Suc ^S	26
EDL-RES P _{ytfE} - <i>tnpR</i>	EDL-RES carrying a P _{ytfE} - <i>tnpR</i> fusion; Sm ^R Kan ^R Gm ^R Amp ^R	This study
Plasmids		
pSTNSK-Cm	<i>oriSC101(Ts) tnsABCD</i> ; Km ^R , Cm ^R	23
pGP-Tn7-Gm	<i>oriR6K mobRP4 Tn7-Gm</i> ; Ap ^R Gm ^R	23
pGOA1193	<i>oriR6K mobRP4 lacZ tnpR</i> ; Ap ^R	24
p1193- <i>ytfE</i>	pGOA1193 P _{ytfE} - <i>tnpR</i> ; Ap ^R	This study

Table S2: Primers used in this study.

Name	Sequence 5'-3'
nsrRmut-F	GTGCAGTTAACGAGTTTCACTGATTACGGATTACGTGCGCTGATCTACATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
nsrRmut-R	GCAAGCGTGTAGTTATCCAGTCCGTAAGAAAACCTTGCACGGCCTTAGACATATGAATATCCTCCTTAGTTCC
nsrR+prom-F	GATCGGGCCCTTCGACGCGTAATTCTGG
nsrR+prom-R	AAGCTGGAGCTCGAAGATTTTCGTCACTCCACCAGC
glmS-F	CACCAATCTTCTACACCGTTCCGC
z5225-R	TCCACAACATGAATTCGCGTAGA
2F10-F	CTGCAGGAAGATCTGTGGTCATCGCGGTTAGAGC
2F10-R	GATCGTGAAGATCTCGATAAGCCATAGCTGATACCTCATTC

*Rôle de l'opéron norVW dans la survie et la
virulence des Escherichia coli
entérohémorragiques durant l'infection*

Contexte et synthèse de l'étude

Parmi les sérotypes fréquemment impliqués dans des cas d'infections à EHEC chez l'Homme, O157:H7 est reconnu comme le principal sérotype responsable d'infections graves chez l'Homme à l'échelle mondiale. Cependant, ces dernières années, l'incidence des sérotypes non O157:H7 n'a cessé d'augmenter. Les principaux facteurs de virulence caractérisés chez les EHEC, notamment les Stx et le T3SS, ne permettent pas de justifier les différences de virulence entre les différents sérotypes. De nombreuses études sont donc menées dans l'optique d'identifier de nouveaux déterminants de la virulence.

Ainsi, le gène *norV* a été identifié comme facteur potentiel de virulence suite à l'analyse du génome d'une souche O157:H7 isolée lors d'une épidémie liée à la consommation d'épinards contaminés. Le gène *norV*, est co-transcrit avec le gène *norW* et ils codent la NO réductase NorVW, qui permet la détoxification du NO en conditions anaérobies et microaérobies. L'expression de *norVW* est régulée par le régulateur senseur de NO NorR, identifié dans l'article 1, comme induit *in vivo* lors de l'infection. De plus, l'importance des interactions entre EHEC et NO pendant le processus infectieux a précédemment été démontré, notamment dans l'article 2, puisque le NO module l'expression des *stx* et des gènes du LEE. Il semble donc logique qu'un système permettant de moduler la concentration en NO ait un rôle important dans la virulence des souches.

Par ailleurs, il existe deux formes du gène *norV* chez les EHEC: un gène intact et fonctionnel (*norV⁺*), et un gène délété de 204 pb (*norV⁻*), qui induit une sensibilité des souches au NO en culture anaérobie. Les souches possédant le gène *norV⁺* ont en outre été associées à un meilleur taux de survie en présence de macrophages, produisant du NO, et à une synthèse de Stx2 plus importante. L'ensemble de ces données suggère que l'opéron *norVW* pourrait contribuer à la virulence des EHEC et l'objectif de cette étude était donc de caractériser son rôle *in vivo* dans la survie et la virulence des EHEC en modèle murin.

Dans cette étude, des mutants de délétion de *norVW* ont été créés avec une souche O157:H7 et une souche O91:H21 dans lesquelles le gène *norV* est présent sous forme fonctionnelle. L'infection de souris avec la souche WT et/ou le mutant a permis de montrer que le gène *norVW* est impliqué dans la persistance dans le tractus digestif, la production de Stx et le fitness de la souche O157:H7 étudiée alors que sa délétion n'a aucun impact sur ces paramètres pour la souche O91:H21. Le traitement des souris avec un inhibiteur de NO synthases a permis de démontrer que l'implication de *norV* dans le fitness de la souche

O157:H7 est effective uniquement lorsque l'hôte produit du NO, suggérant le rôle clé de NorV dans la détoxification du NO *in vivo*.

Ces résultats ont permis de montrer l'importance de la NO réductase NorVW dans la virulence de certaines souches d'EHEC. Cette observation est toutefois souche dépendante et suggère que la réponse des EHEC au stress nitrosant lors d'une infection est complexe et probablement multifactorielle.

**Role of the operon *norVW* in the survival and virulence
of EHEC during infection**

Gardette Marion^{1,2}, Daniel Julien¹, Loukiadis Estelle^{2,3}, Jubelin Grégory^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, INRA, MEDIS UMR454, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² Université de Lyon, CNRS, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup,
Laboratoire d'Ecologie Microbienne, F-63280 Marcy l'Etoile, France

³ VetAgro Sup, Laboratoire national de référence des *E. coli*, F-63280 Marcy-l'Etoile, France

* corresponding author: Grégory Jubelin, INRA Auvergne Rhône-Alpes, UMR454 MEDIS, site
de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. Email: gregory.jubelin@inra.fr

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are bacterial pathogens responsible for life-threatening diseases in humans such as bloody diarrhea and the hemolytic and uremic syndrome. It has been previously shown that interplay between EHEC and nitric oxide (NO), a mediator of the host immune innate response, is critical during the infectious process since NO affects Shiga toxin (Stx) production and bacterial adhesion, and since the NO reductase NorVW participates to the survival of EHEC within macrophages. In this study, we investigated the role of this NO detoxification system in the virulence and fitness of 2 EHEC strains in a murine model of infection. We determined that the deletion of *norVW* in the strain O91:H21 B2F1 has no impact on its virulence whereas it reduced the ability of the strain O157:H7 620 to persist in the gastrointestinal tract of mice and to produce Stx. We also showed that the fitness defect of strain 620 Δ *norVW* was alleviated in mice treated with a NO synthase inhibitor. Altogether, these results reveal that the NO reductase NorVW participates to EHEC resistance against NO produced by the host and promotes virulence through modulation of Stx synthesis. Contribution of this NO detoxification system appears however to be strain-dependent, suggesting that EHEC response to nitrosative stress is complex and probably multifactorial.

INTRODUCTION

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are foodborne pathogens responsible for intestinal disorders in humans that can evolve to life-threatening diseases such as hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS) ¹⁻³. EHEC are classified by O:H serotypes based on their lipopolysaccharide and flagellar antigens. While it can vary between countries and years, a limited number of serotypes are frequently involved in human infections ^{4,5}. Among them, O157:H7 is recognized as the major serotype involved in EHEC outbreaks and sporadic cases of infection worldwide ⁶. It is also noteworthy that the incidence of infection cases related to non-O157:H7 strains are steadily increasing in recent years. In particular, serotypes O26:H11, O103:H2 and O80:H2 are involved in a substantial proportion of infection cases in some countries ^{7,8}. The cardinal virulence factor in EHEC is Shiga toxins (Stx), which are AB₅ proteins where A subunit is the catalytic protein and the five B subunits are required for binding at the surface of target cells ⁹. Once produced in the gut, Stx crosses the intestinal epithelial barrier and gains access to the systemic circulation where it targets the glycolipid globotriaosylceramide-3 (Gb₃) receptors of endothelial cells ¹⁰. Internalization of Stx alters ribosomal function and induces necrosis or apoptosis of vascular endothelial cells, leading to symptoms such as hemorrhagic colitis and HUS ¹¹. EHEC can produce two distinct forms of Stx: Stx1 and Stx2 alone or in combination, and several subtypes have been described for each type of Stx ¹². *stx1* and *stx2* genes are located within lambdoid phages integrated into the bacterial chromosome and their expression is mainly activated through induction of the SOS response ¹³. Epidemiological studies have shown that EHEC strains producing Stx2, especially subtypes Stx2a and Stx2d, are more commonly associated with serious human disease such as HUS, than Stx1-producing strains ^{14,15}.

Although critical for EHEC virulence, Stx is not sufficient *per se* to cause disease in humans and many Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) strains have never been associated with cases of infection (Karmali 2003). Several genes have also been described as virulence genes in EHEC. Epidemiological studies have notably revealed that the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) is frequently detected in EHEC strains causing severe infections. LEE genes encode the type III secretion system (T3SS) which is involved in the formation of attaching and effacing (A/E) lesions on infected epithelial cells, leading to an intimate attachment of EHEC to the gut mucosa ¹⁶. Nevertheless, approximately 10 % of the confirmed EHEC cases reported in the European Union between 2007 and 2010, including HUS patients, were caused by LEE-negative EHEC strains ¹⁷. These strains probably produce other adhesive determinants in order to colonize the gut mucosa efficiently and cause disease. Several potential virulence genes are also located on large plasmids such as the pO157. It is the case for example of *ehxA* that

encodes an enterohaemolysin and is regularly used as a genetic marker for epidemiological studies ¹⁸.

Another study identifies the gene *norV* as a putative virulence determinant in EHEC strain TW14359 ¹⁹. This strain was involved in an outbreak with a particularly high rate of HUS ²⁰. *norV* and the co-transcribed *norW* gene encode a flavorubredoxin and a NADH:(flavo)rubredoxin reductase respectively, involved in nitric oxide (NO) detoxification under anaerobic and microaerobic growth conditions ²¹⁻²³. Two variants of *norV* exist in EHEC: an intact and functional gene (*norV⁺*) and a gene with a 204 bp deletion (*norV⁻*) that renders the strain sensitive to NO under anaerobic growth ^{21,24-26}. A previous study demonstrated that *norV⁺* EHEC strains have a higher survival rate within macrophages and produced more Stx2 than *norV⁻* strains ²⁷. Taken together, these data suggest that *norV* could be a direct virulence factor in EHEC. The capacity to detoxify NO confers an interesting advantage for intestinal pathogens since NO is produced by the host as a toxic defense molecule during infection ²⁸. In the case of EHEC, interplay between NO and the pathogen appears to be even more critical for the outcome of infection since NO has been shown to modulate the expression of both *stx* and LEE genes (Branchu et al., 2014; Gobert et al., 2007; Ichimura et al., 2017; Naïli et al., not published). In this context, aim of this work was to evaluate the role of *norV* in the pathogenicity of two EHEC strains of serotype O157:H7 or O91:H21, using a mouse model of infection. Whereas the deletion of *norVW* does not influence virulence of the O91:H21 strain, we determined that *norVW* contributes to an efficient gut colonization by the O157:H7 strain as well as to a high level of Stx produced in the gut of infected mice. Furthermore, we also showed that *norVW* is critical for an efficient fitness of the O157:H7 strain during infection but only when NO is produced by the host. This work highlights the role of *norVW* in O157:H7 resistance to the nitrosative stress experienced in the gut as well as indirectly in the level of Stx, and by extent to disease outcome.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, mutagenesis and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 and primer sequences are listed in Table S2. Status of *norV* gene in EHEC strains was determined by genome sequence analysis or by PCR using primers *norV*⁺-F and *norV*⁺-R. Streptomycin-resistant strains were constructed by replacing *rspL* gene of indicated strains with *rspL150* gene amplified from MC4100 (conferring resistance to streptomycin) as described in ³². Deletions of *norVW* operons was performed in EHEC strains using the one-step PCR-based method previously described ³³ and with primers *norVW*-mut-R and *norVW*-mut-F. Chromosomal deletions were confirmed by PCR using primers *norVW*-verif-F and *norVW*-verif-R followed by DNA sequencing. Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C unless otherwise indicated. When required, antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (Amp), 50 µg.ml⁻¹; kanamycin (Kan), 25 µg.ml⁻¹; Streptomycin (Sm), 50 µg.ml⁻¹.

Mouse infection

C57BL/6 mice with SPF status were purchased from Janvier Labs (Le-Genest-St-Isle, France). Female mice aged 5 weeks were used throughout the experiments. They were housed in cages containing no more than five animals, maintained under a 12-hour light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2°C and fed with standard diet and water *ad libitum*. The experiments performed herein were reviewed and approved by the Auvergne Committee for Animal Experimentation C2EA (Agreement N°7289-2016093010075533). Mouse experiments were performed with 5-10 mice per group. Mice were given drinking water containing 5 g/L of streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich) one day prior to infection and during 7 days following infection. For some groups, drinking water was also supplemented with 1 g/L of the NOS inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; Enzo Life Science) and changed daily over the course of the experiment. Mice were infected intragastrically at day 0 with 100 µl of PBS containing 10⁷ bacteria. For this, bacteria were grown in LB to mid-logarithmic phase, collected by centrifugation, and resuspended to a concentration of 10⁸ CFU/ml in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Uninfected mice were given PBS only. Body weight and clinical signs of mice were monitored daily to evaluate the severity of infection. Mice presenting weight loss > 15% compared to body weight at day 0, or presenting severe clinical symptoms such as ataxia and lethargy, were immediately euthanized. Fecal samples were collected every day following infection. Feces were homogenized in PBS and diluted before plating on LB+Sm or LB+Sm+Km agar plates to count WT + Δ *norVW* strains and Δ *norVW* alone, respectively. Resuspended feces were centrifuged and supernatant was filtered and stored at - 80°C for subsequent Stx activity quantification. Mice were euthanized at day 7 post-

infection. At necropsy, a piece of colon was collected, cut longitudinally and washed extensively in PBS. Crushing in PBS, dilution and plating were performed to quantify adherent bacteria to the gut mucosa.

For co-infection experiments, mice were infected with a mix containing 10^7 each of WT and $\Delta norVW$ strains. Bacteria were enumerated in feces during 7 days post-infection. Fecal samples dilutions were plated on LB+Sm or LB+Sm+Km agar plates to count WT + $\Delta norVW$ strains and $\Delta norVW$ alone, respectively. Competitive indices were calculated everyday by dividing output ratio (WT/mutant) by the corresponding input ratio (WT/mutant from mouse inoculum).

Stx activity quantification

Shiga toxin activity in fecal samples was measured using a Vero-d2EGFP cell line, that harbors a destabilized variant (half-life = 2 h) of enhanced green fluorescent protein (EGFP) as described previously^{34,35}. Purified Stx2 (Toxin Technology) was used as an internal standard. Fecal sample supernatants previously collected were used for the cytotoxicity assay. Three days prior to intoxication, Vero-d2EGFP cells were seeded in black 96-well plates with clear bottom at 3.10^4 cells per well. They were grown at 5 % CO₂ and 37°C under humidified conditions in a complete medium made of DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco), Zell Shield (Minerva Biolabs) and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Geneticin (Gibco). Samples to be tested as well as purified Stx2 were diluted in complete medium, transferred to Vero-d2EGFP-containing plates and incubated at 37°C for 16 h in a 5 % CO₂ humidified incubator. After incubation, samples were removed and 100 μl of PBS was added to each well. EGFP fluorescence from the Vero-d2EGFP was quantified in a Spark microplate reader (Tecan) with excitation at 485 ± 20 nm and emission at 530 ± 20 nm. Stx activity was expressed as an arbitrary unit by comparing fluorescence values from the standard curve obtained with purified Stx2.

Statistical analyses

All statistics were made using GraphPad Prism software (San Diego, California). Statistical differences between three or more groups were determined using the one-way analysis of variance (ANOVA). Unpaired two-tailed student's t test was used to determine significant differences between two groups. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Selection of $norV^+$ EHEC strains

There are two forms of NO reductase gene *norV* in EHEC, an intact and functional gene ($norV^+$) and a truncated gene with a 204 bp deletion ($norV^-$). We determined the *norV* status in 34 EHEC strains belonging to different serotypes frequently involved in human infection (Table 1). Deleted form of *norV* gene was strictly found in O157:H7 strains, as previously observed^{21,27}. Three O157:H7 and 2 non-O157:H7 strains carrying $norV^+$ gene were next selected for further investigations. For O157:H7 serotypes, selected strains were i) FCH6, a typical O157 strain involved in an outbreak³⁶; ii) 620, a particularly virulent clone, sorbitol-fermenting and associated with a higher incidence of hemolytic uremic syndrome and a higher case fatality rate³⁷ and iii) 540 which was involved in sporadic cases of infection³⁸. The 2 selected non-O157:H7 strains were 21765 (O26:H11) and B2F1 (O91:H21) isolated from HUS cases^{39,40}.

Table 1. Distribution of *norV*, LEE, and *stx* genes in 34 EHEC strains

Serotype	Strain	<i>norV</i>	LEE	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	Source
O157:H7	620	+	+	-	+	Bovine meat
O157:H7	540	+	+	+	+	Bovine meat
O157:H7	FCH6	+	+	-	+	Raw goat's milk cheese
O157:H7	RD9	-	+	+	+	Bovine meat
O157:H7	EDL 933	-	+	+	-	Human
O157:H7	Sakaï	-	+	+	+	Human
O26:H11	21765	+	+	-	+	Raw cow milk cheese
O26:H11	37.40	+	+	+	-	Bovine meat
O26:H11	279/8	+	+	+	-	Raw cow milk cheese
O26:H11	11368	+	+	+	-	Human feces
O103:H2	PMK5	+	+	+	-	Human feces
O103:H2	590	+	+	+	-	Raw cow milk cheese
O103:H2	2503	+	+	+	-	Raw cow milk cheese
O103:H2	03.35	+	+	+	-	Bovine meat
O103:H2	2455-1	+	+	+	+	Raw cow milk cheese
O111:H8	CL37	+	+	-	-	Human
O111:H8	J43	+	+	+	-	Bovine feces
O111:H8	622-4	+	+	+	+	Raw cow milk cheese
O145:H28	2513-21	+	+	-	+	Raw cow milk cheese
O145:H28	991	+	+	+	-	Bovine meat
O145:H28	1036	+	+	-	+	Raw cow milk cheese
O121:H19	12652	+	+	-	+	Human
O121:H19	12805	+	+	-	+	Human
O121:H19	S3075	+	+	-	+	Human
O45:H2	12047	+	+	+	-	Human
O91:H21	13199	+	-	+	+	Bovine meat
O91:H21	B2F1	+	-	-	+	Human feces (HD)
O91:H21	13694	+	-	-	+	Raw cow milk
O113:H21	13341	+	-	-	+	Raw cow milk
O113:H21	14032	+	-	-	+	Bovine meat
O113:H4	13137	+	-	+	-	Sheep meat
O80:H2	38009	+	+	-	+	Human
O80:H2	RDEx444	+	+	-	+	Human
O80:H2	40963	+	+	-	+	Human

Virulence of *norV+* EHEC strains in a mouse model of infection

In order to evaluate the role of *norVW* in EHEC virulence, we first determined the virulence profile of the 5 selected wild-type strains using a mouse model of infection. Groups of mice were orally infected with one of the 5 strains as well as with the reference strain EDL933 and body weight was recorded daily to evaluate the severity of infection (Figure 1). Mice infected with 540, FCH6 or 21765 strains gained body weight during the course of infection, similarly to uninfected mice. Infection with EDL933 and 620 led to the same body weight pattern characterized by a regular increase during the first 6 days and a slight but significant decrease at day 7 post-infection. In contrast, B2F1-infected mice lost weight as soon as day 1 post-infection and body weight was significantly lower than uninfected mice during the entire course of infection. In addition, B2F1-infected mice developed serious clinical signs of disease as previously described⁴¹ and 30 % of mice were moribund or died during the experiment. We also evaluated the amount of Stx released in the gut at day 3 post-infection through quantification of Stx activity from fecal samples using VERO-d2GFP, a Stx-sensitive cell line harboring a destabilized variant of GFP used to monitor protein synthesis inhibition (Quiñones *et al.*, 2009 ; Quiñones and Swimley, 2011). These data revealed that 620 and B2F1 produced a higher level of Stx than the other strains including EDL933, and the difference was significant for strain B2F1 (Figure S1). Based on these results, 620 and B2F1 strains were selected as model strains to further investigate the role of *norVW* operon in EHEC virulence and fitness.

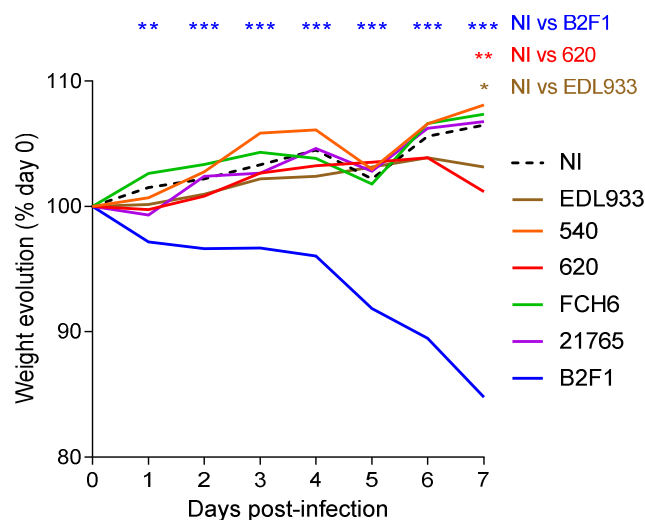


Figure 1. Body weight loss in EHEC-infected mice. Mice were infected by WT strains at day 0 and weight was determined everyday post-infection. Curves are presented as the percentage relative to animal weight at day of infection (day 0) and represent mean values. A multiple two-tailed unpaired t-test was applied to compare uninfected group (NI) with each infected group each day. * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001

norVW involvement in EHEC virulence

To assess the contribution of *norVW* gene to EHEC virulence, we orally inoculated mice with WT or *norVW* mutant from 620 or B2F1 strains and evaluated infection outcome by analyzing weight loss and clinical signs of animals. Body weight curves were not significantly different between WT and Δ *norVW* strains both for 620 and B2F1 (Figure 2A). Indeed, mice infected with 620 WT or Δ *norVW* showed weight increase during the first 6 days post-infection whereas mice challenged with B2F1 WT or Δ *norVW* both exhibited serious clinical symptoms and considerable weight loss. We next evaluated the impact of *norVW* deletion on the ability of strains to colonize the gut through quantification of EHEC concentration in feces during 7 days post-infection (Figure 2B). In mice infected by B2F1, fecal shedding was stable and similar for the WT strain and the deletion mutant during the course of infection. Thus a role of *norVW* in gut colonization was not identified in this strain. In contrast, significantly fewer CFU were recovered from mice infected with 620 Δ *norVW* than from those infected with 620 WT from day 5 to day 7 post-infection. This result demonstrated that *norVW* contributes to the persistence of strain 620 in the gut. We also analyzed EHEC adhesion to intestinal mucosa by quantifying adherent EHEC in colonic samples collected at day 7 post-infection (Figure S2). However, the number of adherent EHEC was highly variable between mice and we were not able to detect significant difference between WT and Δ *norVW* strains from both 620 and B2F1 isolates.

We also investigated whether *norVW* deletion affects the activity of Stx *in vivo* via quantification of Stx activity from animal feces (Figure 2C). First, we noted that Stx activities were higher in feces of animals infected with B2F1 when compared to animals infected with 620, probably explaining why B2F1 is more virulent than 620 strain in mouse. We next compared Stx activities between WT and Δ *norVW* mutant for each strain. We did not observe differences in Stx activity between mice infected with B2F1 WT or mutant strains, demonstrating that *norVW* operon does not alter Stx activity in B2F1. In contrast, Stx activities recorded from 620 Δ *norVW* infected mice were significantly lower than Stx activity measured from mice infected with WT strain between 3 and 7 days post-infection. This result revealed that deletion of *norVW* in 620 strain negatively affects the level of Stx activity expressed in the gut of infected animals. Taken together, these data pointed out that virulence of the Δ *norVW* mutant is attenuated compared to WT for strain 620 but not for strain B2F1, demonstrating that expression of *norVW* can influence the virulence of some but not all EHEC strains.

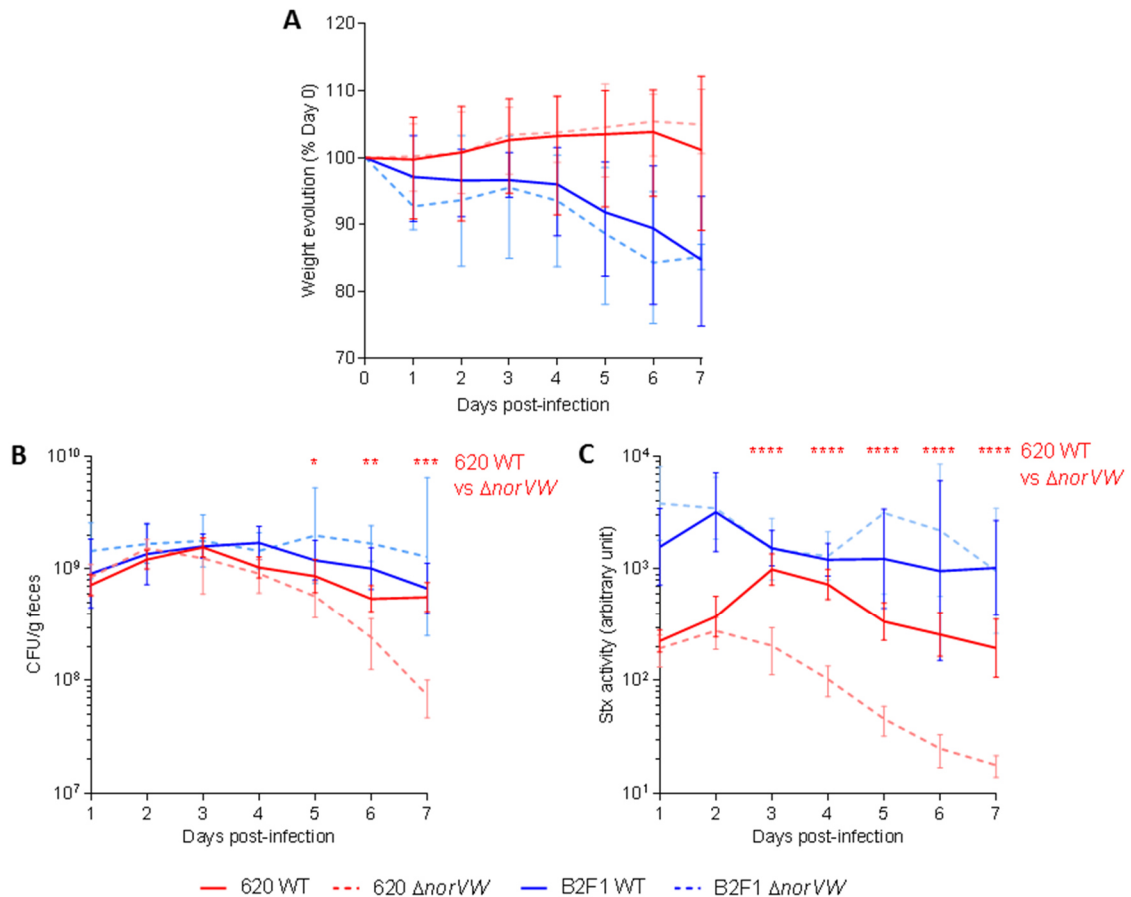


Figure 2. Role of *norVW* gene in the virulence of 620 and B2F1 strains. Mice were infected with WT or *norVW* of 620 or B2F1 strains. **(A)** Mouse weight was determined every day following infection and body weight curves are presented as the percentage relative to animal weight at the day of infection (day 0). Curves represent mean values with standard deviation (SD). **(B)** At the indicated time points, EHEC shedding was quantified by plating fecal samples on LB+Sm plates. Lines represent mean values with SD. **(C)** From day 1 to day 7, Stx activity from fecal samples was quantified using VERO-d2EGFP cells. Curves represent mean values with SD. A multiple two-tailed unpaired t-test was performed to compare WT and Δ *norVW* group of mice for both strain each day. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Role of *norVW* in the fitness of EHEC in the gut of infected mouse

To assess the contribution of *norVW* gene in the fitness of strains 620 and B2F1, mice were co-infected with an equal ratio of WT and mutant strains and both populations were monitored over the course of infection to determine competitive indices (ratio WT/mutant) (Figure 3). Deletion of gene *norVW* had no impact on B2F1 colonization since calculated competitive indices remained close to 1 throughout the experiment. In contrast, competitive indices greatly increased for 620 and reached a mean value of 30 at day 7 post-infection, meaning that 620 WT outcompetes the Δ *norVW* mutant *in vivo*. These data indicated that *norVW* gene has a significant role in the fitness of strain 620 but does not influence B2F1 colonization efficiency.

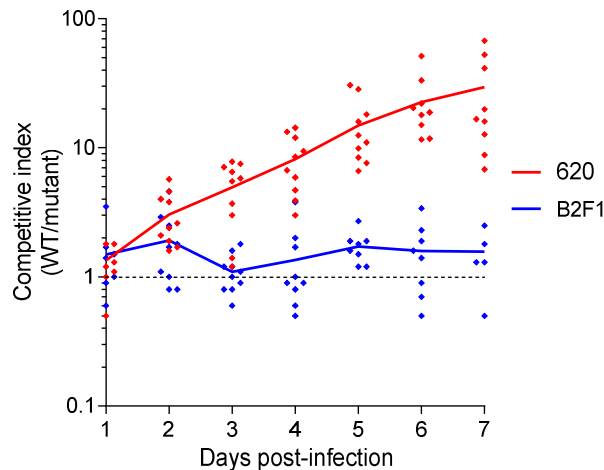


Figure 3. *norVW* is involved in the fitness of 620 but not B2F1. Mice were co-infected at a 1:1 ratio with WT and $\Delta norVW$ strains. At the indicated time points, competitive index (ratio WT/mutant) were determined from the concentrations of WT and mutant strains obtained after plating fecal samples on LB + specific antibiotic plates. Each dot represents one mouse and curves are mean values.

Fitness defect of *norV* mutant is due to the production of NO by the host

Because NO is released in the mouse gut during EHEC infection (Naïli et al., not published), we wondered if the fitness defect observed with 620 $\Delta norVW$ strain is related to the production of NO by the host during infection. Mice were then co-infected with 620 WT and $\Delta norVW$ (ratio 1:1) and treated or not with L-Name, a specific inhibitor of NO synthase (NOS) activity (Figure 4). As previously observed, competitive indices increased during the course of infection in untreated mice. In contrast, competitive indices calculated from mice treated with L-Name were significantly lower than those obtained from control group between days 5 and 7, reaching an average value of 3.9 only at day 7 post-infection. These data demonstrated that the competitive advantage of the WT strain over the $\Delta norVW$ mutant is caused, at least partially, by NO produced by the host.

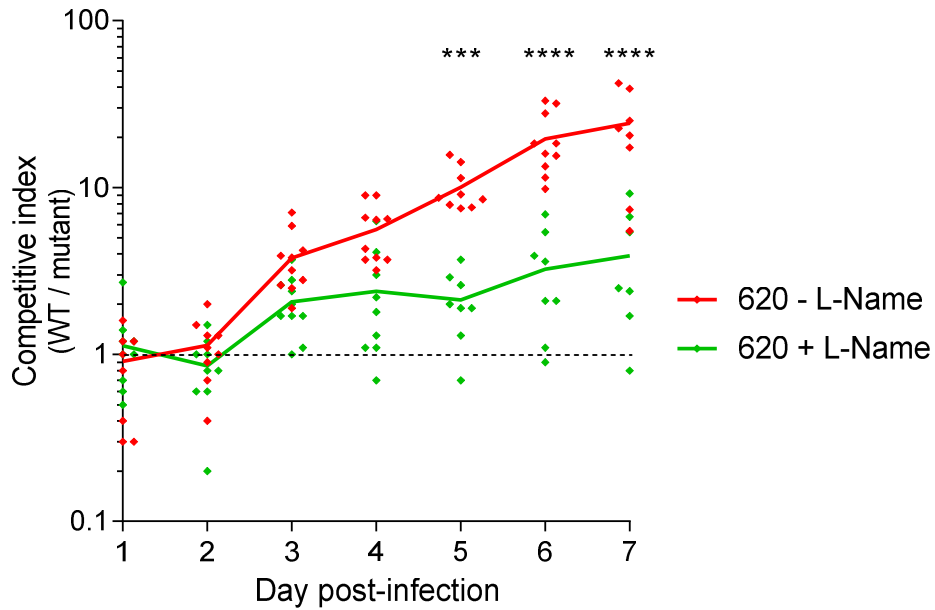


Figure 4. Fitness defect of 620 $\Delta norVW$ is attenuated by the inhibition of NO production by the host. Mice, treated or not with the NOS inhibitor L-Name added in drinking water, were co-infected with 620 WT and $\Delta norVW$ strains at a 1:1 ratio. At the indicated time points, competitive indices (ratio WT/mutant) were determined from the concentrations of WT and mutant strains obtained after plating fecal samples on LB + specific antibiotic plates. Each dot represents one mouse and curves are mean values. A multiple two-tailed unpaired t-test was performed to compare both groups each day. **** P<0.0001

DISCUSSION

During the past decades, NO has been recognized as an important player of the immune system, participating notably to host defense against infectious agents²⁸. However, bacteria possess elaborate mechanisms to sense NO and respond to its presence through detoxification systems. Among them, the NO reductase NorVW, which is involved in NO detoxification under anaerobic and microaerobic growth conditions²¹⁻²³, was identified as one of the *E. coli* O157 proteins expressed during human infection⁴². Thus, the purpose of this study was to examine the contribution of this NO reductase encoded by genes *norVW* to EHEC pathogenesis.

We first demonstrated that deletion of genes *norVW* impacts the fitness of strain O157:H7 620 in the gut. Indeed, we observed increasing competitive indices between WT and deleted strains in the feces during infection, meaning that 620 WT outcompeted the Δ *norVW* mutant *in vivo*. Previous studies evidenced the fact that bacteria, including EHEC, face nitrosative stress during infection. Actually, the expression of several genes involved in NO sensing or detoxification is induced during EHEC infection in human⁴² and in mice⁴³, and NorV itself was identified as one of the *E. coli* O157:H7 proteins expressed during human infection⁴². Furthermore, we previously established that EHEC O157:H7 are able to sense NO in the gut during mice infection (Naïli et al., not published), suggesting that NO sensing by EHEC probably is a critical step in the infectious process. Here, we confirmed that host produced NO is responsible for fitness defect observed in the mutant strain, as competitive indices were reduced when NO synthesis was inhibited in mice. This proves that NorVW is required for the fitness because bacteria face up NO in the gut of infected mice. In addition, former *in vitro* studies demonstrated that *norVW* genes protect EHEC from NO-mediated growth inhibition under anaerobic conditions and confers a protective advantage in resisting killing within macrophage, by reducing NO level^{22,27}. The importance of NO detoxification systems for the fitness was identified in several gut pathogens other than EHEC. For example, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium also possesses the flavorubredoxin encoded by *norV*, and it was shown that this enzyme is important for resistance to NO *in vitro*, along with other detoxification enzymes, as NrfA or Hmp^{44,45}. Actually, disruption of the *hmp* gene in *Salmonella* Typhimurium severely impaired survival in macrophages⁴⁶. Hmp was also identified as a crucial enzyme in uropathogenic *E. coli*, as *hmp* mutants were attenuated in a mouse urinary tract infection model⁴⁷. A *Pseudomonas aeruginosa* *hmp* mutant did not exhibit growth defect in a silk worm model, but abolishing activity of other NO reductase enzymes in this pathogen impaired its virulence⁴⁸. Also, *Helicobacter pylori* mutated on *hp0013*, which encodes a NO reductase, is defective in colonization of the mice stomachs⁴⁹.

Altogether, it shows that NO detoxification by EHEC is essential in the infectious process, and that *norVW* is one of these detoxification systems in O157:H7 620.

Secondly, we showed that *norVW* deletion in 620 strain negatively affects the level of Stx activity expressed in the gut of infected animals. Stx activities recorded from 620 Δ *norVW* infected mice were significantly lower than Stx activity measured from mice infected with WT strain between 3 and 7 days post-infection. Some studies focused on the effect of NO on Stx production but results remain contradictory. It was first shown *in vitro* that NO acts as an inhibitor of *stx* expressing-phage propagation and consequently Stx release⁵⁰. Then another work demonstrated that NO enhances the production of Stx in EHEC grown under *in vitro* anaerobic conditions²⁶. More recently, our team established that presence of NO leads to a significant increase of Stx cytotoxic activity in the gut of infected mice (Naïli et al., not published). Thus, effect of NO on *stx* expression is poorly understood, complex and varies according to environmental conditions. Here, with *norV* mutant 620 strain, we indirectly observe the effect of NO increase, as the detoxification mechanism is inhibited. When NO is not reduced by NorVW, we observe a decrease of Stx cytotoxic activity in the gut. This result is in accordance with a previous *in vitro* study, which reported that the presence of *norVW* gene resulted in higher level of Stx2 within macrophages anaerobically²⁷. Additionally, our results evidenced a reduction of bacterial shedding in mice infected with mutant strain 620 starting from day 5 post-infection. Interestingly, the loss of Stx activity occurred 2 days before the defect in feces colonization, indicating that the diminished Stx activity was not a consequence of a reduced number of bacteria in the gut. Actually, the diminished ability of 620 Δ *norVW* to colonize the gut could be a consequence of the decreased Stx activity. Indeed, it was previously reported that Stx significantly enhance the capacity of EHEC O157:H7 to adhere to epithelial cells and to colonize the intestines of mice⁵¹.

Finally, we demonstrated that importance of *norVW* genes vary between strains. Indeed, deletion of *norVW* genes in strain O91:H21 B2F1 had no impact, neither on the bacterial shedding in feces and the fitness in the gut, nor on Stx activity measured in feces. A possible explanation could be a functional redundancy between *norVW* and another gene involved in NO detoxification. In fact, transcriptional analyses revealed overexpression of several genes in response to NO stress in *E. coli* strains grown aerobically or anaerobically^{52,53}. Among them *hmp* encodes a flavohemoglobin and comparison of the NO susceptibility of *hmp* and *norVW* mutant *E. coli* strains suggested that both are functionally important under anaerobic conditions⁵². More recently, it was confirmed that the NO reductase activity of Hmp is important in EHEC for anaerobic growth in the presence of high concentrations of NO *in vitro*⁵⁴. Moreover, as mentioned above, multiple NO detoxification systems were also identified in *Salmonella* Typhimurium. In this pathogen, it was shown that HmpA, NorV and NrfA act

cooperatively for nitrosative stress tolerance^{44,55}. And Bang et al., in 2006 also showed that WT and $\Delta norV$ mutants of *Salmonella* possess similar virulence in a murine model, because of functional redundancy between NorV and NrfA. This is consistent with our results on strain B2F1.

Altogether, our results argue that establishment of an adapted response to nitrosative stress is a key component both for the adaptation of EHEC to the gut and the control of its virulence program. In strain O157:H7 620, the gene *norVW* plays a central role in this response, influencing fitness, Stx activity and, directly or indirectly, persistence in the gut; while it is not involved in strain O91:H21 B2F1. It is well established that several NO-detoxification systems exist in EHEC⁵⁷ and it was demonstrated that bacterial responses can be differentially influenced by specific NO concentrations²⁶. Thus, one possible explanation for the differences observed between the studied strains, is that they use different NO-detoxification systems in the same environmental conditions. Finally, the major interest of this work was to evidence the involvement of the NO reductase NorVW in the survival and virulence of an O157:H7 strain during infection.

1. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, et al. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *N Engl J Med* 1983; 308:681–5.
2. Hofmann SL. Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like Toxins in Hemolytic-Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic. *Am J Med Sci* 1993; 306:398–406.
3. Karmali MA, Petric M, Steele BT, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983;
4. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 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* 2003; 41:4930–40.
5. Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Le Hello S, Lefevre S, Jourdan- Da Silva N, Nisavanh A, Mailles A, Bonacorsi S, de Valk H. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2017. 2017.
6. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140:360–70.
7. Valilis E, Ramsey A, Sidiq S, DuPont HL. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* - A poorly appreciated enteric pathogen: Systematic review. *Int J Infect Dis* 2018; 76:82–7.
8. Soysal N, Mariani-Kurkdjian P, Smail Y, Liguori S, Gouali M, Loukiadis E, Fach P, Bruyand M, Blanco J, Bidet P, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:1604–12.
9. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* 1988; 171:45–50.
10. Schüller S. Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins (Basel)* 2011; 3:626–39.
11. Ray PE, Liu XH. Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2001; 16:823–39.
12. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2014; 2.
13. Krüger A, Lucchesi PMA. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology* 2015; 161:451–62.
14. Siegler RL, Obrig TG, Pysher TJ, Tesh VL, Denkers ND, Taylor FB. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003; 18:92–6.
15. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. Shiga Toxin Activatable by Intestinal Mucus in *Escherichia coli* Isolated from Humans: Predictor for a Severe Clinical Outcome. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1160–7.

16. Schmidt MA. LEEways: Tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol* 2010; 12:1544–52.
17. Messens W, Bolton D, Frankel G, Liebana E, McLauchlin J, Morabito S, Oswald E, Threlfall EJ. Defining pathogenic verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from cases of human infection in the European Union, 2007–2010. *Epidemiol Infect* 2015; 143:1652–61.
18. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20:5–14.
19. Kulasekara BR, Jacobs M, Zhou Y, Wu Z, Sims E, Saenphimmachak C, Rohmer L, Ritchie JM, Radey M, Mckevitt M, et al. Analysis of the Genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 Spinach-Associated Outbreak Isolate Indicates Candidate Genes That May Enhance Virulence. *Infect Immun* 2009; 77:3713–21.
20. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, Mladonicky JM, Somsel P, Rudrik JT, Dietrich SE, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:4868–73.
21. Gardner AM, Helmick RA, Gardner PR. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002; 277:8172–7.
22. Hutchings MI, Mandhana N, Spiro S. The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J Bacteriol* 2002; 184:4640–3.
23. Gardner AM, Gessner CR, Gardner PR. Regulation of the Nitric Oxide Reduction Operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2003; 278:10081–6.
24. Shimizu T, Hirai S, Yokoyama E, Ichimura K, Noda M. An evolutionary analysis of nitric oxide reductase gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Infect Genet Evol* 2015; 33:176–81.
25. Gardner AM, Gardner PR. Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*: Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J Biol Chem* 2002; 277:8166–71.
26. Ichimura K, Shimizu T, Matsumoto A, Hirai S, Yokoyama E, Takeuchi H, Yahiro K, Noda M. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Microbiologyopen* 2017; 6:1–17.
27. Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol Microbiol* 2012; 85:492–512.
28. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2:907–16.
29. Gobert AP, Vareille M, Glasser A-L, Hindré T, De Sablet T, Martin C. Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF- κ B Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 2007; 178:8168–74.
30. Branchu P, Matrat S, Vareille M, Garrivier A, Durand A, Crépin S, Harel J, Jubelin G, Gobert AP. NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog* 2014; 10.

31. Naïli I, Gardette M, Garrivier A, Daniel J, Rousseau V, Desvaux M, Pizza M, Gobert A, Marchal T, Loukiadis E, et al. Interplay between enterohemorrhagic *Escherichia coli* and nitric oxide during the infectious process. Not Published
32. Gill AE, Amyes SGB. The Contribution of a Novel Ribosomal S12 Mutation to Aminoglycoside Resistance of *Escherichia coli* Mutants . J Chemother 2014; 16:347–9.
33. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS 2000; 97:6640–5.
34. Quiñones B, Massey S, Friedman M, Swimley MS, Teter K. Novel cell-based method to detect shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 and inhibitors of toxin activity. Appl Environ Microbiol 2009; 75:1410–6.
35. Quiñones B, Swimley MS. Use of a Vero Cell-Based Fluorescent Assay to Assess Relative Toxicities of Shiga Toxin 2 Subtypes from *Escherichia coli*. In: Microbial Toxins. Humana Press, Totowa, NJ; 2011. page 61–71.
36. Espié E, Vaillant V, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Martin-Schaller R, De Valk H, Vernozy-Rozand DC. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. Epidemiol Infect 2006; 134:143–6.
37. King LA, Loukiadis E, Mariani-Kurkdjian P, Haeghebaert S, Weill F-X, Baliere C, Ganet S, Gouali M, Vaillant V, Pihier N, et al. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7 via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. Clin Microbiol Infect 2014; 20:1136–44.
38. Kerangart S, Douëllou T, Delannoy S, Fach P, Beutin L, Sergentet-Thévenot D, Cournoyer B, Loukiadis E. Variable tellurite resistance profiles of clinically-relevant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) influence their recovery from foodstuffs. Food Microbiol 2016; 59:32–42.
39. Espié E, Grimont F, Pihier N, Debré H, Pasteur I. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese. 2008.
40. Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Nishibuchi M. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91 : H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. Microb Pathog 1990; 8:47–60.
41. Lindgren SW, Melton AR, Brien ADO. Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91 : H21 Clinical Isolates in an Orally Infected Mouse Model. Infect Immun 1993; 61:3832–42
42. John M, Kudva IT, Griffin RW, Dodson AW, Mcmanus B, Krastins B, Sarracino D, Progulsk-Fox A, Hillman JD, Handfield M, et al. Use of *In vivo*-Induced Antigen Technology for Identification of *Escherichia coli* O157:H7 Proteins Expressed during Human Infection. Infect Immun 2005; 73:2665–79.
43. Gardette M, Le Hello S, Mariani-Kurkdjian P, Fabre L, Gravey F, Garrivier A, Loukiadis E, Jubelin G. Identification and prevalence of *in vivo*-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Virulence 2019; 18:180–93.
44. Mills PC, Rowley G, Spiro S, Hinton JCD, Richardson DJ. A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. Microbiology 2008; 154:1218–28.

45. Mills PC, Richardson DJ, Hinton JCD, Spiro S. Detoxification of nitric oxide by the flavorubredoxin of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:198–9.
46. Gilberthorpe NJ, Lee ME, Stevanin TM, Read RC, Poole RK. NsrR: a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative and nitrosative stress *in vitro* and in IFN-gamma-stimulated J774.2 macrophages. *Microbiology* 2007; 153:1756–71.
47. Svensson L, Poljakovic M, Säve S, Gilberthorpe N, Schön T, Strid S, Corker H, Poole RK, Persson K. Role of flavohemoglobin in combating nitrosative stress in uropathogenic *Escherichia coli* – Implications for urinary tract infection. *Microb Pathog* 2010; 49:59–66.
48. Arai H, Iiyama K. Role of Nitric Oxide-Detoxifying Enzymes in the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* against the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77:198–200.
49. Justino MC, Ecobichon C, Fernandes AF, Boneca IG, Saraiva LM. *Helicobacter pylori* has an unprecedented nitric oxide detoxifying system. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17:1190–200.
50. Varelle M, De Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PNAS* 2007; 104:10199–204.
51. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O’Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *PNAS* 2006; 103.
52. Justino MC, Vicente JB, Teixeira M, Saraiva LM. New Genes Implicated in the Protection of Anaerobically Grown *Escherichia coli* against Nitric Oxide. *J Biol Chem* 2005; 280:2636–43.
53. Pullan ST, Gidley MD, Jones RA, Barrett J, Stevanin TM, Read RC, Green J, Poole RK. Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: Unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation. *J Bacteriol* 2007; 189:1845–55.
54. Shimizu T, Matsumoto A, Noda M. Cooperative roles of NO-metabolizing enzymes to counteract nitrosative stress in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2019;
55. Mühlig A, Kabisch J, Pichner R, Scherer S, Müller-Herbst S. Contribution of the NO-detoxifying enzymes HmpA, NorV and NrfA to nitrosative stress protection of *Salmonella* Typhimurium in raw sausages. *Food Microbiol* 2014; 42:26–33.
56. Bang I-S, Liu L, Vazquez-Torres A, Crouch M-L, Stamler JS, Fang FC. Maintenance of Nitric Oxide and Redox Homeostasis by the *Salmonella* Flavohemoglobin Hmp. *J Biol Chem* 2006; 281:28039–47.
57. Vine CE, Cole JA. Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. *Biochem Soc Trans* 2011; 39:213–5.
58. King LA, Mailles A, Mariani-Kurkdjian P, Vernozy-Rozand C, Montet MP, Grimont F, Pihier N, Devalk H, Perret F, Bingen E, et al. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiol Infect* 2009; 137:889–96.
59. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han C-G, 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.

60. Neto M. et al. Public health significance of *E. coli* O26 isolated from foodstuffs: toward genetic predictors of their virulence. *Zoonoses Public Health* 2012; 59.
61. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, et al. Population structure of *Escherichia coli* O26 : H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages. *Microb genomics* 2017; 3.
62. Mariani-Kurkdjian P, Denamur E, Milon A, Picard B, Cave H, Lambert-Zechovsky N, Loirat C, Goulet P, Sansonetti PJ, Elion J. Identification of a Clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a Potential Agent of Hemolytic-Uremic Syndrome in France. *J Clin Microbiol* 1993; 31:296–301.
63. Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4486–92.
64. Bibbal D, Loukiadis E, Kérourédan M, Ferré F, Dilasser F, Peytavin De Garam C, Cartier P, Oswald E, Gay E, Auvray F, et al. 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* 2015; 81:1397–405.

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

Table S1. Bacterial strains and plasmid used in this study

Strains	Description	References
RD9	O157:H7 isolated from bovine meat and implicated in human infection	58
Sakaï	O157:H7 isolated from human feces	59
37.40	O26:H11 isolated from bovine meat and implicated in human infection	60
279/8	O26:H11 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
11368	O26:H11 isolated from human feces	61
PMK5	O103:H2 isolated from human feces	62
590	O103:H2 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
2503	O103:H2 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
03.35	O103:H2 isolated from bovine meat and implicated in human infection	38
2455-1	O103:H2 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
CL37	O111:H8 isolated from human feces	63
J43	O111:H8 isolated from bovine feces	64
622-4	O111:H8 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
2513-21	O145:H28 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
991	O145:H28 isolated from bovine meat and implicated in human infection	38
1036	O145:H28 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
12652	O121:H19 isolated from human feces	38
12805	O121:H19 isolated from human feces	38
S3075	O121:H19 isolated from human feces	38
12047	O45:H2 isolated from human feces	38
13199	O91:H21 isolated from bovine meat and implicated in human infection	38
13694	O91:H21 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
13341	O113:H21 isolated from raw cow's milk cheese and implicated in human infection	38
14032	O113:H21 isolated from bovine meat and implicated in human infection	38
13137	O113:H4 isolated from sheep meat and implicated in human infection	38

540 WT	O157:H7 isolated from bovine meat and implicated in human infection	38
540 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of 540; Sm ^R	This study
540 ΔnorVW	540 Sm ^R Δ norVW; Sm ^R Kan ^R	This study
620 WT	O157:H7 isolated from bovine meat and implicated in human infection	37
620 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of 620; Sm ^R	This study
620 ΔnorVW	620 Sm ^R Δ norVW; Sm ^R Kan ^R	This study
FCH6	O157:H7 isolated from raw goat's milk cheese and implicated in human infection	36
FCH6 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of FCH6; Sm ^R	This study
FCH6 ΔnorVW	FCH6 Sm ^R Δ norVW; Sm ^R Kan ^R	This study
21765	O26:H11 isolated from raw goat's milk cheese and implicated in human infection	39
21765 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of 21765; Sm ^R	This study
21765 ΔnorVW	21765 Sm ^R Δ norVW; Sm ^R Kan ^R	This study
B2F1	O91:H21 isolated from human feces	40
B2F1 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of B2F1; Sm ^R	This study
B2F1 ΔnorVW	B2F1 Sm ^R Δ norVW; Sm ^R Kan ^R	This study
EDL933 Sm^R	Streptomycin-resistant derivative of O157:H7 EDL933; Sm ^R	43
Plasmid		
pKD46	Temperate-sensitive (replicates at 30°C) plasmid bearing the FLP recombinase gene, (Amp ^R)	33
pKD4	Template plasmid for amplification of a Kan cassette flanked by FLP recognition sites (FRT; Amp ^R Km ^R)	33

Table S2. Primers used in this study

Name	Sequence 5'-3'	References
norV+-F	GGCCATGGAACACGCTGAATAAATTG	24
norV+-R	CCAAGCTTTTGCCTCCGATGCCA	24
rpsI-F	CTGACCAATGACGCGACGAC	This study
rpsI-R	GACTGGTCAAATTTGAAACGA	This study
norVW-mut-F	GCAATTAGCAAGACATCTTTTTAGAACACGCTGAATAA ATTGAGGTTGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
norVW-mut-R	GGATAAGACGCGCCAGCGTCGCATCCGACATTTTAGGC ACAGTAGCCCACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	This study
norVW-verif-F	CACGCTGAATAAATTGAGGTTGC	This study
norVW-verif-R	GATAAGACGCGCCAGCGTC	This study

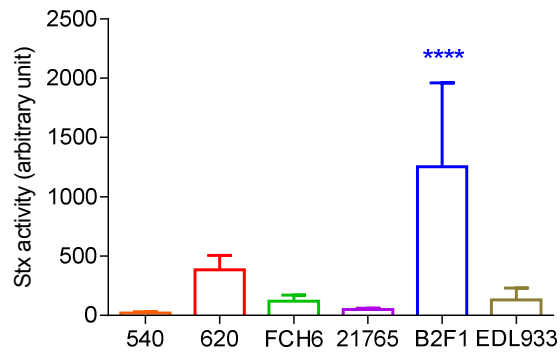
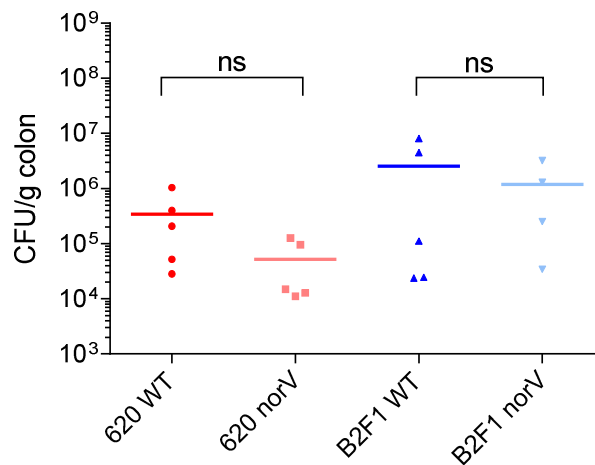


Figure S1. Stx activity in feces of infected mice. At day 3, Stx activity from fecal samples was quantified using VERO-d2EGFP cells. Data are shown as means + standard deviations. One-way ANOVA test was applied to compare all groups. **** P<0.0001.



Figures S2. *norVW* deletion has no effect on EHEC adhesion to colon. At day 7 post-infection, mice were euthanized and colon were sampled, washed in PBS, crushed and then plated on LB + Sm plates in order to quantify mucosa-associated EHEC. Each dot represent one mouse and means are indicated as a line. A two-tailed unpaired t-test was applied to compare both groups. ns: not significant.

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les EHEC sont des pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires chez l'Homme. Ils sont principalement portés par les bovins, qui sont porteurs sains, et des épidémies liées à ce pathogène sont régulièrement recensées à l'échelle mondiale. Les infections à EHEC induisent des symptômes graves, notamment le SHU, qui est la première cause d'insuffisance rénale chez les enfants de moins de 5 ans. L'absence de traitements efficaces constitue actuellement le problème majeur de ces infections. En effet, les antibiotiques sont proscrits puisqu'ils favoriseraient le développement du SHU. Et, malgré les efforts fournis par les industries agroalimentaires pour éviter la contamination des denrées et l'existence de techniques de détection, des aliments contaminés se retrouvent régulièrement sur le marché. Il semble donc primordial de mieux comprendre la physiopathologie des infections à EHEC et les interactions hôte-pathogène qui ont lieu lors du processus infectieux afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans ce cadre que s'est inscrit mon travail de thèse. Ainsi, ce projet avait pour objectifs, d'une part, d'identifier de nouveaux facteurs bactériens potentiellement impliqués dans le processus infectieux et d'autre part, de caractériser *in vivo* la réponse des EHEC au stress nitrosant, qui intervient dans le processus de défense de l'hôte contre l'infection, afin de mieux appréhender les interactions entre EHEC, NO et hôte.

D'abord, dans l'optique de développer nos connaissances sur la physiopathologie des infections à EHEC, un criblage RIVET a été appliqué à la souche EDL933 en modèle murin, afin d'identifier de nouveaux facteurs de virulence et/ou des facteurs auxiliaires impliqués dans le fitness et la virulence des EHEC. Cette étude a permis l'identification de 31 gènes induits *in vivo* (*ivi*), pour la plupart impliqués dans l'adaptation du pathogène au tractus gastro-intestinal, notamment via l'adaptation du métabolisme ou la réponse au stress. De manière intéressante, certains gènes identifiés ici codent des protéines impliquées dans des voies métaboliques qui ont déjà été identifiées comme induites lors de l'infection chez l'Homme dans une précédente étude (John et al., 2005). Parmi ces gènes, des gènes impliqués dans le catabolisme des glucides, *araB* et *araC* notamment pour l'utilisation de l'arabinose, et *agaW* pour l'utilisation des N-galactosamines, sont particulièrement intéressants. En effet, il semblerait exister un lien entre l'utilisation de ces deux sources de carbone et la forte virulence des souches d'EHEC (Kerangart et al., 2018). De plus, la capacité à métaboliser l'arabinose confèrent aux bactéries un avantage pour la colonisation intestinale (Fabich et al., 2008).

Ensuite, les EHEC s'adaptent également grâce à l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress. Il semble qu'il y ait induction du système SOS, puisqu'un des gènes *ivi* identifié, *ydjM*, appartient au régulon LexA, dont l'expression est induite par l'activation du

système SOS. Ensuite, l'induction des gènes *mdtEF* et *mdtM*, codant des pompes à efflux, et le gène *yhiL*, codant une protéine de sécrétion, a été identifiée et indique la mise en place de structures membranaires spécialisées dans l'élimination de molécules nocives. Il a notamment déjà été montré que MdtEF protège les *E. coli* contre le stress nitrosant en conditions anaérobies (Zhang et al., 2011). Les gènes *norR* et *ytfE*, ont également été identifiés comme induits *in vivo* et sont impliqués dans la réponse au stress NO. Par ailleurs, de précédents résultats ont démontré que le NO affecte l'expression de *stx* et des gènes du LEE (Branchu et al., 2014; Ichimura et al., 2017; Vareille et al., 2007). Il semble donc que l'induction des mécanismes de défense contre le stress nitrosant soit une composante clé de l'adaptation des EHEC dans le tractus gastro-intestinal et dans le contrôle de la virulence.

Par ailleurs, 5 gènes *ivi* identifiés sont présents dans des *O-islands*. Ce sont donc des gènes spécifiques des EHEC, ce qui suggère leur potentielle implication dans la virulence. Parmi ces 5 gènes, *z4799* présente un intérêt particulier. Il coderait une protéine similaire à DprA retrouvée chez *Streptococcus pneumoniae*, et impliquée dans la fixation de RecA sur l'ADN. Par transposition, *Z4799* pourrait donc participer à l'activation du système SOS chez les EHEC et ainsi induire la synthèse de Stx. De plus, nous avons obtenu des données (non-publiées) qui montrent que *z4799* inhibe l'activation du système SOS et que sa délétion conduit à une souche hypervirulente *in vivo*. Même si les résultats obtenus sont à l'opposé de l'effet attendu initialement, cela montre que *Z4799* affecte la virulence d'une souche O157:H7 probablement à travers un impact sur la production de Stx; il serait cependant intéressant d'approfondir l'étude de son rôle dans la virulence. Par ailleurs, l'étude de prévalence a révélé que *z4799* ainsi que 7 autres gènes *ivi* présentent une prévalence hétérogène dans la collection de souches d'EHEC analysée. L'étude de la co-distribution de ces 8 gènes *ivi* et des gènes de virulence connus a montré que ces gènes ont une prévalence plus élevée dans les souches possédant le gène *stx2*, seul ou associé à *stx1*, que dans celles possédant uniquement *stx1*, et 4 de ces gènes *ivi* ont une prévalence plus grande dans les souches *eae*⁺. Or, des études épidémiologiques ont établi que les souches d'EHEC produisant le T3SS et les Stx2 sont associées à un risque de développement de SHU plus élevé. Cela suggère donc que ces 8 gènes *ivi* pourraient potentiellement contribuer à la virulence des souches d'EHEC hautement pathogènes. Dans cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien significatif entre la présence de ces gènes et les symptômes cliniques graves, mais cela est probablement dû au fait que les informations cliniques liées aux souches étudiées étaient insuffisantes. Il serait donc intéressant, par la suite, de rechercher la prévalence de ces gènes dans des souches pour lesquelles davantage d'informations cliniques sont disponibles.

Un des 8 gènes *ivi* avec une distribution hétérogène qui présente un intérêt particulier est le gène *mhpR*. Il est impliqué dans le métabolisme des composés aromatiques puisque *MhpR* est l'activateur transcriptionnel d'un opéron codant les enzymes nécessaires à la transformation du 3HPP (3-(3-hydroxyphenyl)propionate) en intermédiaires du cycle de Krebs. Le 3HPP est présent dans le tractus digestif des animaux, y compris l'Homme, et provient du métabolisme bactérien anaérobie des flavonoïdes et des acides aminés aromatiques dérivés de plantes. Une précédente étude a montré que l'expression de *mhpR* chez EDL933 est plus élevée chez les souches après croissance *in vitro* dans le contenu cæcal de rats possédant un microbiote intestinal humain que de rats axéniques (Le Bihan et al., 2015). De plus, nos résultats montrent que la délétion de *mhpR* chez EDL933 induit une diminution du fitness de la souche dans le tractus gastro-intestinal de souris. L'ensemble de ces données suggère donc que la souche EHEC EDL933 utilise le 3HPP produit par le microbiote intestinal pour coloniser efficacement le tractus gastro-intestinal. Un autre substrat d'intérêt potentiel est l'acide γ -amino-butérique (GABA). En effet, le gène *gabT*, qui code une amino-transférase GABA, et le gène *yjiR*, un régulateur transcriptionnel potentiel qui pourraient réguler l'expression de *gabT*, ont été identifiés parmi les gènes *ivi*, ce qui suggère qu'EDL933 est capable d'utiliser le GABA dans le tractus gastro-intestinal. Or, de nombreux commensaux du tube digestif peuvent dégrader le L-glutamate en GABA mais n'ont pas les enzymes pour ensuite utiliser le GABA. La capacité à utiliser le GABA comme substrat pourrait donc conférer un avantage compétitif à EDL933. Ces données sont intéressantes puisqu'elles identifient des substrats qui pourraient constituer des nutriments spécifiquement utilisés par les EHEC pour la colonisation intestinale. Ainsi, cela apporte une piste de réflexion pour limiter la colonisation. En effet, il serait utile d'étudier d'avantage le rôle du 3HPP et du GABA dans la colonisation intestinale et de déterminer si la réduction de la disponibilité de ces substrats dans le tractus digestif aurait pour conséquence la diminution de la colonisation par les EHEC.

Plusieurs autres gènes appartenant aux 8 gènes *ivi* ayant une distribution hétérogène, ont une fonction inconnue mais pourraient également être liés au potentiel de virulence. Par exemple, le gène *Z0964* est porté par un prophage sur lequel se trouvent également les gènes *nleB*, *nleC*, *nleD* et *nleH1*, qui codent des effecteurs du T3SS. Le gène *Z3135*, en outre, code une protéine qui contient des motifs répétés largement retrouvés dans des protéines de surface bactérienne comme l'intimine, impliquées dans la pathogénicité des EHEC.

Ainsi, la première partie de ce travail a permis de mettre en évidence des gènes codant de potentiels facteurs de niche qui pourraient augmenter la capacité des souches d'EHEC à causer des symptômes graves chez l'Homme. Il constitue une base solide pour de futurs travaux de caractérisation plus poussée de ces gènes, en particulier les 8 gènes *ivi* présentant une

distribution hétérogène dans les souches d'EHEC. Il serait intéressant de réaliser des infections en modèle murin avec les souches mutées sur chacun de ces gènes pour étudier l'impact de cette délétion sur les facteurs de virulence et la pathogénicité des souches. De plus, comme expliqué précédemment, étudier l'importance des substrats 3HPP et GABA pour la colonisation présente un intérêt particulier. Enfin ces résultats ont démontré l'importance de la réponse au stress nitrosant, qui a été étudié davantage dans la seconde partie de ce travail.

Le NO est une molécule de la réponse immune mucoale, produite notamment par les cellules épithéliales intestinales lors d'une inflammation. De précédentes études menées au laboratoire ont montré que le NO avait un effet inhibiteur, *in vitro*, sur les deux principaux facteurs de virulence des EHEC, à savoir la synthèse de Stx et le T3SS (Branchu et al., 2014; Vareille et al., 2007), ce qui suggère que le NO a un potentiel rôle protecteur dans les infections à EHEC. En se basant sur ces données *in vitro*, et sur les résultats exposés précédemment montrant que plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress nitrosant sont induits *in vivo* lors de l'infection, nous avons étudié le rôle du NO dans le devenir des infections à EHEC *in vivo* en modèle murin.

D'abord, la construction et la validation d'une souche d'EHEC senseur de NO a constitué un point central au cours de cette étude. En effet, cette souche a une capacité de colonisation identique à celle de la souche WT dans le tractus gastro-intestinal des souris, et elle permet de réaliser à la fois un suivi de la détection du NO *in situ* et d'évaluer l'effet de ce dernier sur l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales dans le temps. L'avantage majeur de ce système est qu'il permet la détection du NO même si la présence de ce dernier n'est que transitoire. L'inconvénient, en revanche, est qu'il est impossible de travailler en cinétique avec ce type de système senseur, puisque le changement phénotypique des souches est irréversible. Par ailleurs, il n'existe à ce jour pas de dispositifs permettant le dosage du NO directement dans le tractus digestif des rongeurs, ce paramètre est donc difficile à mesurer. L'utilisation d'un tel système de senseur biologique présente donc un grand intérêt et il pourrait servir dans d'autre contexte par exemple pour valider l'efficacité de différents types de molécules inhibitrices des NO synthases, ou dispositifs permettant de moduler la concentration en NO dans le tractus digestif.

Dans la présente étude, l'utilisation de cette souche repitrice a permis de montrer que le NO est bien produit dans le tractus digestif de souris infectées et que les EHEC sont capables de le détecter. Cette capacité à détecter le NO pourrait effectivement avoir une importance pour la colonisation du tractus digestif puisque la délétion du régulateur transcriptionnel senseur de NO, NsrR, a eu pour conséquence la diminution du fitness de la souche dans le modèle de co-infection utilisé. Cela pourrait être lié, au moins en partie, à l'inhibition de

l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales, comme observé dans une précédente étude *in vitro* (Branchu et al., 2014). Par ailleurs, nous avons également montré que le nombre d'EHEC adhérents au côlon après 7 jours d'infection est plus élevé chez les souris traitées au L-Name, c'est-à-dire chez lesquelles la synthèse de NO a été inhibée.

En revanche, contrairement aux résultats précédemment obtenus *in vitro* au laboratoire, cette étude a montré que le NO semble avoir un effet stimulateur sur la production des Stx dans le tractus digestif des souris. En effet, l'activité cytotoxique des Stx mesurée dans les fèces des souris traitées au L-Name est significativement plus faible que celle observée dans les fèces des souris n'ayant pas subi ce traitement pendant 5 jours suivant l'infection. Ce résultat peut être expliqué par une récente étude, qui a montré qu'en conditions anaérobies, le NO induit une augmentation de la production de Stx1 et Stx2 par les EHEC (Ichimura et al., 2017). L'environnement digestif étant un milieu anaérobie, notre résultat est donc cohérent avec cette étude. De plus, nous avons démontré que chez les souris infectées et traitées à la ciprofloxacine, qui induit une production importante de Stx, le traitement au L-Name induit un maintien de la densité urinaire comme chez les souris non infectées. A l'opposé, la densité urinaire diminue chez les souris infectées non traitées au L-Name, ce qui suggère une défaillance rénale chez les souris lorsqu'il y a présence de NO. Cette défaillance a par ailleurs été confirmée avec l'analyse histologique des tissus rénaux, et plus spécifiquement avec l'observation d'une modification de la structure des glomérules. En effet, chez les souris infectées et non traitées au L-Name, nous avons observé une diminution ou une disparition de la capsule de Bowman, une diminution de la taille des glomérules et une augmentation du nombre de cellules mésangiales. Il est intéressant de noter que la présence des récepteurs Gb3 n'a jamais été rapportée sur les cellules glomérulaires de souris et les lésions observées ici ne semblent pas être la conséquence d'une cytotoxicité, puisqu'aucun phénomène d'apoptose n'a été observé. Ainsi, la diminution de la taille des glomérules, expliquée par l'augmentation du nombre de cellules mésangiales, qui ont un rôle contractile, pourrait correspondre à une adaptation de la physiologie rénale pour limiter les dommages induits par la toxine. En effet, la contraction des glomérules engendre une diminution de la filtration sanguine ; ce mécanisme pourrait donc limiter l'accès au rein des Stx présentes dans le sang. La diminution de la filtration sanguine supposée est notamment cohérente avec la diminution de la densité urinaire que nous avons observée dans ce groupe. Pour vérifier l'hypothèse d'une adaptation de la physiologie rénale par l'augmentation du nombre de cellules mésangiales, il pourrait être intéressant de réaliser un marquage histologique avec l'antigène Ki67, un marqueur de prolifération, qui permettrait de confirmer la multiplication des cellules mésangiales suite à l'infection dans des conditions de synthèse de NO normales.

L'ensemble de ces résultats indique que, contrairement à ce qui était attendu, le NO aggrave le devenir de l'infection chez la souris, et il semblerait que ce phénomène soit lié à une augmentation de la production de Stx. Cependant, outre une augmentation de la production de Stx directement liée à la présence de NO, l'aggravation des symptômes pourrait être due à un effet indirect du NO, étant donné son implication dans de nombreux systèmes biologiques. Par exemple, la présence de NO pourrait induire une meilleure translocation des Stx à travers la muqueuse intestinale. En effet, il a été démontré que le NO contribue à un dysfonctionnement de la barrière intestinale chez les rongeurs par une augmentation de la perméabilité intestinale (Quirino et al., 2013; Unno et al., 1997). De plus, il est connu que le NO est impliqué dans la physiologie rénale et la pression artérielle, et pourrait ainsi aggraver l'altération de la fonction rénale en présence de Stx (Bachmann and Mundel, 1994; Hsu and Tain, 2019). Il a notamment été montré que l'inhibition de la synthèse de NO diminue le débit sanguin rénal (Jover and Mimran, 2001), ce qui pourrait limiter la quantité de Stx atteignant efficacement les reins, et expliquer l'absence de dommages rénaux chez les souris traitées au L-Name.

Il est cependant important de préciser que l'induction de la iNOS *in vitro*, et donc la production de NO par les macrophages murins ou humains est différente, et ces résultats pourraient donc être différents chez l'Homme. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir mesurer la production de NO lors de l'infection chez l'Homme, pour comparer cette donnée entre les patients présentant un SHU et ceux ne développant pas ce symptôme, puisqu'une production élevée de NO liée à une inflammation importante pourrait avoir un impact sur le développement du SHU. Le caractère pro-inflammatoire du développement du SHU et des dommages rénaux chez les patients est bien décrit. En particulier, l'observation d'une leucocytose, qu'elle soit circulante ou localisée dans les reins, est considérée comme un facteur de prédiction du SHU (Bell et al., 1997). Chez l'Homme, la réponse immunitaire au niveau des reins, qui fait suite à l'apoptose des cellules rénales cibles, conduit à une sécrétion importante de cytokines et à une arrivée massive de leucocytes par chimiotaxie. Parmi eux, les neutrophiles et les macrophages, qui sont des acteurs majeurs dans les infections à EHEC et le développement du SHU, ont été spécifiquement reliés à une augmentation de la mortalité (Coad et al., 1991; Inward et al., 1997). Par ailleurs, des cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur TNF- α , sont produites dans les reins, lors de l'infection, et retrouvées dans les urines des patients (Karpman et al., 1995). Ce facteur serait impliqué dans la pathogénicité liée au SHU ; en effet, chez la souris, la présence de Stx induit la sécrétion de TNF- α dans les reins et augmente la sensibilité rénale à la toxicité de ce même facteur (Harel et al., 1993). De plus, le traitement avec un inhibiteur de TNF- α diminue les dommages aux reins et au cerveau (Isogai et al., 1998). Ainsi, un état inflammatoire important semble lié au

développement et à la progression du SHU chez les patients mais les mécanismes associés ne sont pas complètement définis. Étant donnés nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que chez les patients développant un SHU, une inflammation très importante induit une augmentation de la production de NO, en plus de la leucocytose et de la production de cytokines, et ainsi une augmentation des Stx, en considérant que les résultats obtenus chez la souris sont transposables à l'Homme. Cette augmentation des Stx provoquerait alors une aggravation du SHU chez les patients concernés.

Les résultats des deux premiers articles de ce travail confirment que les EHEC font bien face à un stress nitrosant au cours du processus infectieux. Ainsi, dans le but de poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les interactions EHEC-hôte-NO, nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de la NO réductase bactérienne NorVW. Le gène *norV* a été identifié comme potentiel facteur de virulence direct des EHEC au cours d'une précédente étude (Kulasekara et al., 2009). Il est co-transcrit avec *norW* et les deux gènes codent la NO réductase NorVW, qui permet la détoxification du NO en conditions microaérobies et anaérobies. L'expression de *norVW* est régulée par le régulateur senseur de NO NorR, qui fait partie des gènes identifiés comme induits *in vivo* lors de l'infection, dans le premier chapitre de cette thèse. Le gène *norV* a la particularité d'être présent sous deux formes chez les EHEC : le gène intact et fonctionnel (*norV*⁺), et le gène délété de 204 pb (*norV*⁻), qui induit une sensibilité des souches au NO en culture anaérobie. Les souches possédant le gène *norV*⁺ ont en outre été associées à un meilleur taux de survie en présence de macrophages, un type cellulaire produisant des quantités importantes de NO, et à une synthèse de Stx2 plus importante (Shimizu et al., 2012). Sur la base de ces données, nous avons étudié le rôle de *norVW* dans la virulence et le fitness en modèle murin de deux souches possédant le gène *norV* fonctionnel : O157:H7 620 et O91:H21 B2F1.

D'abord, nous avons observé que la délétion du gène *norVW* n'avait pas d'impact sur l'état clinique général des souris, évalué par leur perte de poids. En revanche, nous avons démontré que la délétion de *norVW* chez la souche O157:H7 620 avait un effet négatif sur le fitness de cette dernière dans le tractus gastro-intestinal des souris. Nous avons confirmé que la diminution du fitness du mutant était bien liée à la production de NO par l'hôte puisque nous avons observé une diminution de l'avantage compétitif de la souche WT par rapport à la souche mutée dans un groupe de souris traitées au L-Name. Par ailleurs, la délétion de *norVW* a également eu un impact négatif sur la persistance de la souche dans le tractus digestif et sur l'activité cytotoxique des Stx dosées dans les fèces. Si on considère que l'inactivation du système de détoxification conduit indirectement à une augmentation de la concentration en NO, on peut conclure que la présence d'une quantité de NO supérieure induit une diminution

de la production de Stx par la souche 620. Ce résultat est donc contradictoire avec l'étude précédente. On peut cependant noter que la souche utilisée n'est pas la même, et la variabilité des résultats obtenus concernant l'effet du NO sur la production des Stx dans de précédents travaux montre bien que ce mécanisme est visiblement complexe et très variable en fonction des conditions expérimentales. Notre résultat est tout de même cohérent avec une précédente étude *in vitro* démontrant une production de Stx2 accrue par une souche d'EHEC possédant le gène *norV* fonctionnel, après croissance en anaérobiose en présence de macrophages (Shimizu et al., 2012). Ainsi, ces données montrent l'importance de la NO réductase NorVW pour la virulence et le fitness de la souche O157:H7 620.

A l'opposé, la délétion de *norVW* chez la souche O91:H21 B2F1 n'a eu aucun effet sur le fitness, la persistance dans le tractus digestif ou la production de Stx. Ce résultat démontre que les mécanismes de défense contre le stress nitrosant sont souche-dépendants. L'absence d'effets suite à la délétion de *norVW* est certainement liée à une redondance fonctionnelle avec une ou plusieurs autres enzymes. Notamment, il a récemment été décrit que l'enzyme codée par *hmp* était impliquée dans la détoxification anaérobie du NO (Shimizu et al., 2019), alors que cette enzyme avait initialement été identifiée comme privilégiée pour la détoxification aérobie du NO. De plus, la redondance des systèmes de détoxification du NO a déjà été décrite chez un autre pathogène entérique : le sérovar Typhimurium de *Salmonella enterica* (Bang et al., 2006). Il pourrait être intéressant d'identifier ces systèmes redondants dans la souche O91:H21 B2F1 en réalisant une étude de virulence en modèle murin similaire à celle-ci mais avec des mutants multiples sur les systèmes de détoxification du NO connus. Par ailleurs, on peut noter que la souche O91:H21 B2F1 est particulièrement virulente dans le modèle murin traité à la streptomycine, alors que la plupart des souches d'EHEC n'induisent pas de signes cliniques dans ce modèle. Cette virulence importante est certainement liée à une production de Stx plus élevée. Ainsi, étant donné la singularité de cette souche, d'une part dans la réponse au stress nitrosant et d'autre part dans la virulence, il semblerait intéressant de caractériser les gènes impliqués dans la virulence. La technologie RIVET pourrait par exemple être appliquée à cette souche afin d'identifier les gènes induits *in vivo* lors de l'infection, et qui pourraient donc avoir un rôle dans le processus infectieux.

Pour finir, nous nous sommes intéressés au régulateur senseur de NO NorR, qui régule principalement l'expression de *norVW*. Le rôle important de ce dernier dans la souche O157:H7 620 suggère que la caractérisation du régulon NorR dans cette souche pourrait être intéressante. Ce travail a été initié au cours de cette thèse, en réalisant une analyse de RNAseq à partir de cultures de la souche O157:H7 620 WT ou délétée du gène *norR*, cultivée en

présence ou en absence de NO. L'exploitation des résultats n'ayant pas encore été réalisée, ceux-ci ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

Pour conclure, l'intérêt majeur de ce travail de thèse réside dans l'utilisation du modèle *in vivo* permettant d'intégrer la complexité de l'environnement digestif. Il a permis d'identifier de nouveaux déterminants potentiels de la virulence et d'apporter des connaissances nouvelles sur les interactions entre les EHEC et le système immunitaire de l'hôte, et en particulier le NO. L'objectif initial, établi suite à des études menées *in vitro*, de développer une stratégie thérapeutique basée sur un apport de NO pour limiter le devenir de l'infection, ne pourra finalement pas être suivi. Cependant, ce travail a confirmé le rôle important du NO dans le développement de l'infection et de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la modulation de la concentration en NO dans le tractus gastro-intestinal pourraient être envisagées.

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publications

Publication 1, publiée dans *Virulence* :

Marion Gardette, Simon Le Hello, Patricia Mariani-Kurkdjian, Laetitia Fabre, François Gravey, Annie Garrivier, Estelle Loukiadis et Grégory Jubelin. Identification and prevalence of *in vivo*-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. 16 Mars 2016.

doi: 10.1080/21505594.2019.1582976

Publication 2, soumise dans *Gut Microbes* :

Marion Gardette, Ilham Naïli, Annie Garrivier, Julien Daniel, Mickaël Desvaux, Mariagrazia Pizza, Alain Gobert, Thierry Marchal, Estelle Loukiadis, Grégory Jubelin. Interplay between enterohemorrhagic *Escherichia coli* and nitric oxide during the infectious process.

Publication 3, en cours de rédaction, projet de soumettre dans *Environmental Microbiology* :

Marion Gardette, Julien Daniel, Estelle Loukiadis, Grégory Jubelin. Role of the operon *norVW* in the survival and virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* during infection.

Communications orales

16^{ème} Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, 09 Avril 2019. Rôle de la NO réductase NorVW dans la survie et la virulence des *Escherichia coli* entérohémorragiques au cours du processus infectieux.

22^{ème} Journées de l'École Doctorale SVSAE, 23 mai 2019. Rôle du monoxyde d'azote dans le devenir des infections à *Escherichia coli* entérohémorragiques

Concours « Ma Thèse en 180 secondes », demi-finale clermontoise, 08 mars 2019. "Intoxication alimentaire : une bataille sans merci contre les bactéries dans l'intestin". Vidéo disponible : <https://www.youtube.com/watch?v=yMwKP8pWmz4&t=34s>

Communications affichées

10^{ème} Symposium international VTEC. Florence, Italie. Mai 2018, 2 posters :

- Identification of STEC genes specifically induced *in vivo*: potential new genetic markers for risk assessment?
- Role of nitric oxide in enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection.

15^{ème} Congrès national de la SFM « Microbes ». Septembre 2019, 2 posters :

- What role does nitric oxide play in the outcome of EHEC infections?
- Role of the operon norVW in the survival and virulence of EHEC during infection.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aertsen, A., Houdt, R. Van, and Michiels, C. W. (2005). Construction and use of an *stx1* transcriptional fusion to *gfp*. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**, 73–77.
- AFSSA (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines Coordonnateurs de rédaction :
- AFSSA (2010). Afssa – Saisine n°2010-SA-0031 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008.
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Leomil, L., Dahbi, G., et al. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 297–306.
- Alam, M. S., Akaike, T., Okamoto, S., Kubota, T., Yoshitake, J., Sawa, T., et al. (2002). Role of Nitric Oxide in Host Defense in Murine Salmonellosis as a Function of Its Antibacterial and Antiapoptotic Activities. *Infect. Immun.* **70**, 3130–3142.
- Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., et al. (2014). Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota. *Gastroenterology* **147**, 1055-1063.e8.
- Alheid, U., Frölich, J. C., and Förstermann, U. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb. Res.* **47**, 561–71.
- Angelo, M., Hausladen, A., Singel, D. J., and Stamler, J. S. (2008). Interactions of NO with Hemoglobin: From Microbes to Man. *Methods Enzymol.* **436**, 131–168.
- Anjum, M. F., Stevanin, T. M., Read, R. C., and Moir, J. W. B. (2002). Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **184**, 2987–93.
- Anonymous (2000). Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep* **26**, 170–3.
- ANSES (2017). Avis de l'Anses Saisine n° 2016-SA-0121 Saisines liées n°2013-SA-0223 ; 2010-SA-0031.
- Arai, H., Hayashi, M., Kuroi, A., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2005). Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 3960–8.
- Arai, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1995). Expression of the nir and nor genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS Lett.* **371**, 73–76.
- Arai, H., Roh, J. H., Eraso, J. M., and Kaplan, S. (2013). Transcriptome response to nitrosative stress in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 111–118.
- Arnold, K. W., and Kaspar, C. W. (1995). Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2037–9.
- Bachmann, S., and Mundel, P. (1994). Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am. J. Kidney Dis.* **24**, 112–29.
- Bang, I.-S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.-L., Stamler, J. S., and Fang, F. C. (2006). Maintenance of Nitric Oxide and Redox Homeostasis by the *Salmonella* Flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **281**, 28039–28047.
- Baptista, J. M., Justino, M. C., Melo, A. M. P., Teixeira, M., and Saraiva, L. M. (2012). Oxidative Stress Modulates the Nitric Oxide Defense Promoted by *Escherichia coli* Flavorubredoxin. *J. Bacteriol.* **194**, 3611–3617.

- Barnett Foster, D. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* **4**, 315–323.
- Barrett, T. J., Kaper, J. B., Jerse, A. E., and Wachsmuth, I. K. (1992). Virulence Factors in Shiga-like Toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from Humans and Cattle. *J. Infect. Dis.* **165**, 979–980.
- Beaumont, H. J. E., Lens, S. I., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V., and Van Spanning, R. J. M. (2004). Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol. Microbiol.* **54**, 148–158.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 625–651.
- Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M., and Tarr, P. I. (1997). Predictors of Hemolytic Uremic Syndrome in Children During a Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *Pediatrics* **100**.
- Benabdallah, H., Messaoudi, D., and Gharzouli, K. (2008). The spontaneous mechanical activity of the circular smooth muscle of the rabbit colon *in vitro*. *Pharmacol. Res.* **57**, 132–141.
- Benjamin, M. M., and Datta, A. R. (1995). Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1669–72.
- Bentancor, L. V., Bilen, M., Brando, R. J. F., Ramos, M. V., Ferreira, L. C. S., Ghiringhelli, P. D., et al. (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**, 712–8.
- Berger, C. N., Crepin, V. F., Baruch, K., Mousnier, A., Rosenshine, I., and Frankel, G. (2012). EspZ of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Regulates Type III Secretion System Protein Translocation. *MBio* **3**.
- Bernstein, H., Payne, C. M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S. E., and Crowley, C. L. (1999). Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol. Lett.* **108**, 37–46.
- Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Blanco, J., Blanco, J., Dehem, M., Aujard, Y., et al. (2007). Combined Multilocus Sequence Typing and O Serogrouping Distinguishes *Escherichia coli* Subtypes Associated with Infant Urosepsis and/or Meningitis. *J. Infect. Dis.* **196**, 297–303.
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., and Karch, H. (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 521–529.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Aldick, T., Schürk-Bulgrin, R., and Karch, H. (2006). Shiga Toxin Activatable by Intestinal Mucus in *Escherichia coli* Isolated from Humans: Predictor for a Severe Clinical Outcome. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1160–1167.
- Bielaszewska, M., Idelevich, E. A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., et al. (2012). Effects of Antibiotics on Shiga Toxin 2 Production and Bacteriophage Induction by Epidemic *Escherichia coli* O104:H4 Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3277–82.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., et al. (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**, 671–676.
- Boccoli, J., Loidl, C. F., Lopez-Costa, J. J., Creydt, V. P., Ibarra, C., and Goldstein, J. (2008). Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 altered the expression levels of neuronal nitric oxide synthase and glial fibrillary acidic protein in rat brains. *Brain Res.*

- 1230**, 320–333.
- Bodenmiller, D. M., and Spiro, S. (2006). The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* **188**, 874–81.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907–916.
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161–178.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173**, 17–26.
- Böhme, G. A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J.-M., et al. (1993). Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9191–9194.
- Bono, J. L., Keen, J. E., Clawson, M. L., Durso, L. M., Heaton, M. P., and Laegreid, W. W. (2007). Association of *Escherichia coli* O157:H7 *tir* polymorphisms with human infection. *BMC Infect. Dis.* **7**.
- Bouladoux, N., Harrison, O. J., and Belkaid, Y. (2017). The Mouse Model of Infection with *Citrobacter rodentium*. *Curr. Protoc. Immunol.* **119**.
- Bourret, T. J., Porwollik, S., McClelland, M., Zhao, R., Greco, T., Ischiropoulos, H., et al. (2008). Nitric oxide antagonizes the acid tolerance response that protects *Salmonella* against innate gastric defenses. *PLoS One* **3**.
- Branchu, P., Matrat, S., Varelle, M., Garrivier, A., Durand, A., Crépin, S., et al. (2014). NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog.* **10**.
- Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 682–685.
- Brett, K. N., Ramachandran, V., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., Walker, M. J., and Djordjevic, S. P. (2003). *stx1c* is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 926–36.
- Brown, C. A., Harmon, B. G., Zhao, T., and Doyle, M. P. (1997). Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 27–32.
- Brugère, H., Auvray, F., Mariani-Kurkdjian, P., King, L. A., and Loukiadis, E. (2011). *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* **50**, 23–28.
- Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., and Karch, H. (1999). The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* **145**, 1005–1014.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., King, L.-A., Van Cauteren, D., Lefevre, S., et al. (2019). Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016.
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P., and Beutin, L. (2011). Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiol.* **11**.
- Bush, M., and Dixon, R. (2012). The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ_{54} -dependent transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 497–529.
- Bush, M., Ghosh, T., Tucker, N., Zhang, X., and Dixon, R. (2010). Nitric oxide-responsive interdomain regulation targets the sigma54-interaction surface in the enhancer binding protein NorR. *Mol. Microbiol.* **77**, 1278–1288.

- Bush, M., Ghosh, T., Tucker, N., Zhang, X., and Dixon, R. (2011). Transcriptional regulation by the dedicated nitric oxide sensor, NorR: a route towards NO detoxification. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 289–293.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 262–310.
- Calderwood, S. B., and Mekalanos, J. J. (1987). Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J. Bacteriol.* **169**, 4759–4764.
- Cannon, R. O. (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* **44**.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., and Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol.* **57**, 81–89.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., and Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3525–35.
- Castiglione, N., Rinaldo, S., Giardina, G., and Cutruzzola, F. (2009). The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* specifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**, 2838–2844.
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S. Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., et al. (2011). Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Invest.* **121**, 966–75.
- Choi, H.-J., Kim, S.-J., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J.-R., Storz, G., et al. (2001). Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell* **105**, 103–113.
- Chong, Y., Fitzhenry, R., Heuschkel, R., Torrente, F., Frankel, G., and Phillips, A. D. (2007). Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7 initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology* **153**, 794–802.
- Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A. R., and Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* **11**.
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., and Silverman, R. B. (2019). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med. Res. Rev.*, 1–32.
- Cizek, A., Literak, I., and Scheer, P. (2000). Survival of *Escherichia coli* O157 in faeces of experimentally infected rats and domestic pigeons. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 349–352.
- Clarke, T. A., Mills, P. C., Poock, S. R., Butt, J. N., Cheesman, M. R., Cole, J. A., et al. (2008). "Escherichia coli Cytochrome c Nitrite Reductase NrfA," in *Methods in Enzymology* (Academic Press), 63–77.
- Clementi, E., and Nisoli, E. (2005). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: A key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **142**, 102–110.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558.
- 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.
- Clermont, O., Gordon, D., and Denamur, E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol.* **161**, 980–988.

- Coad, N. A., Marshall, T., Rowe, B., and Taylor, C. M. (1991). Changes in the postenteropathic form of the hemolytic uremic syndrome in children. *Clin. Nephrol.* **35**, 10–6.
- Conceição, R. A., Ludovico, M. S., Andrade, C. G. T. J., and Yano, T. (2012). Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. *Brazilian J. Med. Biol.* **45**, 417–24.
- Constantinidou, C., Hobman, J. L., Griffiths, L., Patel, M. D., Penn, C. W., Cole, J. A., et al. (2006). A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J. Biol. Chem.* **281**, 4802–15.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B., and 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**, 2153–2160.
- Cooper, C. E. (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411**, 290–309.
- Cordonnier, C., Etienne-Mesmin, L., Thévenot, J., Rougeron, A., Rénier, S., Chassaing, B., et al. (2017). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Sci. Rep.* **7**, 44655.
- Cordonnier, C., Le Bihan, G., Emond-Rheault, J.-G., Garrivier, A., Harel, J., and Jubelin, G. (2016). Vitamin B12 Uptake by the Gut Commensal Bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* Limits the Production of Shiga Toxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Toxins (Basel)*. **8**.
- Corker, H., and Poole, R. K. (2003). Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **278**, 31584–31592.
- Cowden, J. M. (1997). Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157, November-December 1996. *Eurosurveillance* **2**, 1–2.
- Crack, J. C., Munnoch, J., Dodd, E. L., Knowles, F., Al Bassam, M. M., Kamali, S., et al. (2015). NsrR from *Streptomyces coelicolor* is a nitric oxide-sensing [4Fe-4S] cluster protein with a specialized regulatory function. *J. Biol. Chem.* **290**, 12689–704.
- Crane, B. R., Sudhamsu, J., and Patel, B. A. (2010). Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 445–470.
- Crawford, M. J., and Goldberg, D. E. (1998). Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 34028–32.
- Crepin, V. F., Prasannan, S., Shaw, R. K., Wilson, R. K., Creasey, E., Abe, C. M., et al. (2005). Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol. Microbiol.* **55**, 1658–1670.
- Croxen, M. A., and Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., and Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 822–880.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M. N., Scott, C., Thomson, A. J., et al. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235–44.
- D'Autréaux, B., Horner, O., Oddou, J.-L., Jeandey, C., Gambarelli, S., Berthomieu, C., et al. (2004). Spectroscopic Description of the Two Nitrosyl-Iron Complexes Responsible for

- Fur Inhibition by Nitric Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6005–6016.
- D'Autréaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J.-M., and Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16619–24.
- D'Autréaux, B., Tucker, N. P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005). A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**, 769–772.
- D'Autréaux, B., Tucker, N., Spiro, S., and Dixon, R. (2008). Characterization of the Nitric Oxide-Reactive Transcriptional Activator NorR. *Methods Enzymol.* **437**, 235–251.
- Darfeuille-Michaud, A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 185–193.
- Davies, B. W., Bogard, R. W., Dupes, N. M., Gerstenfeld, T. A. I., Simmons, L. A., and Mekalanos, J. J. (2011). DNA Damage and Reactive Nitrogen Species are Barriers to *Vibrio cholerae* Colonization of the Infant Mouse Intestine. *PLoS Pathog.* **7**.
- Dean-Nystrom, E. A., Stoffregen, W. C., Bosworth, B. T., Moon, H. W., and Pohlenz, J. F. (2008). Early Attachment Sites for Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Inoculated Weaned Calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6378–6384.
- Delahay, R. M., Knutton, S., Shaw, R. K., Hartland, E. L., Pallen, M. J., and Frankel, G. (1999). The Coiled-coil Domain of EspA Is Essential for the Assembly of the Type III Secretion Translocon on the Surface of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 35969–35974.
- Delannoy, S., Beutin, L., and Fach, P. (2013). Towards a Molecular Definition of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Detection of Genes Located on O Island 57 as Markers To Distinguish EHEC from Closely Related Enteropathogenic *E. coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1083–1088.
- Dell'Albani, P., Santangelo, R., Torrisi, L., Nicoletti, V. G., de Vellis, J., and Giuffrida Stella, A. M. (2001). JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* **65**, 417–424.
- Deupree, S. M., and Schoenfisch, M. H. (2009). Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater.* **5**, 1405–1415.
- Di Napoli, M. R., Calderon, C. L., and Lopez, D. M. (1996). The Altered Tumoricidal Capacity of Macrophages Isolated from Tumor-bearing Mice Is Related to Reduced Expression of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *J. Exp. Med.* **183**, 1323–29.
- Dong, N., Liu, L., and Shao, F. (2010). A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis. *EMBO J.* **29**, 1363–1376.
- Dong, T., and Schellhorn, H. E. (2009). Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics* **10**, 349.
- Dran, G. I., Fernández, G. C., Rubel, C. J., Bermejo, E., Gomez, S., Meiss, R., et al. (2002). Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* **62**, 1338–1348.
- Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., et al. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm. Res.* **7**, 756–61.
- Dudzinski, D. M., Igarashi, J., Greif, D., and Michel, T. (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 235–276.
- Durbach, S. I., Springer, B., Machowski, E. E., North, R. J., Papavinasasundaram, K. G., Colston, M. J., et al. (2003). DNA alkylation damage as a sensor of nitrosative stress in

- Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**, 997–1000.
- 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.
- EFSA (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food).
- EFSA (2015). Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.* **13**.
- EFSA, and ECDC (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. John Wiley & Sons, Ltd.
- EFSA, and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **16**.
- Einsle, O. (2011). Structure and Function of Formate-Dependent Cytochrome c Nitrite Reductase, NrfA. *Methods Enzymol.* **496**, 399–422.
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Girón, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., et al. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 6115–26.
- Elvers, K. T., Turner, S. M., Wainwright, L. M., Marsden, G., Hinds, J., Cole, J. A., et al. (2005). NssR, a member of the Crp-Fnr superfamily from *Campylobacter jejuni*, regulates a nitrosative stress-responsive regulon that includes both a single-domain and a truncated haemoglobin. *Mol. Microbiol.* **57**, 735–750.
- Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Giron, J. A. (2007). Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435.
- 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.
- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., et al. (2011). Interactions with M Cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. *PLoS One* **6**.
- Fabich, A. J., Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., et al. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **76**, 1143–1152.
- Falguières, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., et al. (2001). Targeting of Shiga Toxin B-Subunit to Retrograde Transport Route in Association with Detergent-resistant Membranes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2453–2468.
- Fang, F. C. (1997). Perspectives Series: Host/Pathogen Interactions. *J clin invest* **99**, 2818–2825.
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832.
- Farfan, M. J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D. J., and Torres, A. G. (2011). Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infect. Immun.* **79**, 3744–3750.
- Fileenko, N., Spiro, S., Browning, D. F., Squire, D., Overton, T. W., Cole, J., et al. (2007). The NsrR Regulon of *Escherichia coli* K-12 Includes Genes Encoding the Hybrid Cluster Protein and the Periplasmic, Respiratory Nitrite Reductase. *J. Bacteriol.* **189**, 4410–4417.

- Fink, R. C., Black, E. P., Hou, Z., Sugawara, M., Sadowsky, M. J., and Diez-Gonzalez, F. (2012). Transcriptional Responses of *Escherichia coli* K-12 and O157:H7 Associated with Lettuce Leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1752–1764.
- Fleischhacker, A. S., and Kiley, P. J. (2011). Iron-containing transcription factors and their roles as sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 335–41.
- Förster, A. H., and Gescher, J. (2014). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 16.
- Förstermann, U., Boissel, J. P., and Kleinert, H. (1998). Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* **12**, 773–90.
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 898–907.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., et al. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1771–80.
- Franzin, F. M., and Sircili, M. P. (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res. Int.* **2015**.
- Frey, A., Giannasca, K. T., Weltzin, R., Giannasca, P. J., Reggio, H., Lencer, W. I., et al. (1996). Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J. Exp. Med.* **184**, 1045–1059.
- Friesema, I., van der Zwaluw, K., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., van Duynhoven, Y., et al. (2014). Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Euro Surveill.* **19**, 26–32.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732.
- Fuchs, S., Mühldorfer, I., Donohue-Rolfe, A., Kerényi, M., Emödy, L., Alexiev, R., et al. (1999). Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* **27**, 13–23.
- Fujii, J., Kinoshita, Y., Kita, T., Higure, A., Takeda, T., Tanaka, N., et al. (1996). Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect. Immun.* **64**, 5053–60.
- Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N., et al. (1994). Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect. Immun.* **62**, 3447–53.
- Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376.
- Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000). HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria 1 Edited by P. E. Wright. *J. Mol. Biol.* **295**, 605–612.
- Gao, X., Wan, F., Mateo, K., Callegari, E., Wang, D., Deng, W., et al. (2009). Bacterial Effector Binding to Ribosomal Protein S3 Subverts NF- κ B Function. *PLoS Pathog.* **5**.
- García, A., Bosques, C. J., Wishnok, J. S., Feng, Y., Karalius, B. J., Butterstock, J. R., et al. (2006). Renal Injury Is a Consistent Finding in Dutch Belted Rabbits Experimentally Infected with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **193**, 1125–1134.
- García, A., Marini, R. P., Catalfamo, J. L., Knox, K. A., Schauer, D. B., Rogers, A. B., et al. (2008).

- Intravenous Shiga toxin 2 promotes enteritis and renal injury characterized by polymorphonuclear leukocyte infiltration and thrombosis in Dutch Belted rabbits. *Microbes Infect.* **10**, 650–656.
- Gardner, A. M., and Gardner, P. R. (2002). Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*: Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 8166–8171.
- Gardner, A. M., Helmick, R. A., and Gardner, P. R. (2002). Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8172–8177.
- Garred, O., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1995). Furin-induced Cleavage and Activation of Shiga Toxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 10817–21.
- Garthwaite, J., Charles, S. L., and Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**, 385–388.
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., and González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**.
- Giardina, G., Rinaldo, S., Castiglione, N., Caruso, M., and Cutruzzolà, F. (2009). A dramatic conformational rearrangement is necessary for the activation of DNR from *Pseudomonas aeruginosa*. Crystal structure of wild-type DNR. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **77**, 174–180.
- Gilberthorpe, N. J., Lee, M. E., Stevanin, T. M., Read, R. C., and Poole, R. K. (2007). NsrR: a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative and nitrosative stress *in vitro* and in IFN-gamma-stimulated J774.2 macrophages. *Microbiology* **153**, 1756–71.
- Girardeau, J. P., Dalmaso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., et al. (2005). Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 6098–6107.
- Gobert, A. P., Vareille, M., Glasser, A.-L., Hindré, T., De Sablet, T., and Martin, C. (2007). Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF- κ B Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* **178**, 8168–8174.
- Goldwater, P. N., and Bettelheim, K. A. (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Med.* **10**.
- Gomes, C. M., Giuffrè, A., Forte, E., Vicente, J. B., Saraiva, L. M., Brunori, M., et al. (2002). A Novel Type of Nitric-oxide Reductase. *J. Biol. Chem.* **277**, 25273–76.
- Gomes, C. M., Vicente, J. B., Wasserfallen, A., and Teixeira, M. (2000). Spectroscopic studies and characterization of a novel electron-transfer chain from *Escherichia coli* involving a flavorubredoxin and its flavoprotein reductase partner. *Biochemistry* **39**, 16230–16237.
- Grainger, D. C., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D. F., and Busby, S. J. W. (2007). Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic Acids Res.* **35**, 269–78.
- Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1991). The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157: H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**, 60–98.
- Grimont, P. A. D. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine Mal. Infect.* **17**, 6–10.
- Grys, T. E., Siegel, M. B., Lathem, W. W., and Welch, R. A. (2005). The StcE Protease Contributes

- to Intimate Adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to Host Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1295–1303.
- Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect.* **2**, 907–913.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* **85**, 45–62.
- Hamm, K., Barth, S. A., Stalb, S., Geue, L., Liebler-Tenorio, E., Teifke, J. P., et al. (2016). Experimental Infection of Calves with *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci. Rep.* **6**, 32812.
- Hanashima, T., Miyake, M., Yahiro, K., Iwamaru, Y., Ando, A., Morinaga, N., et al. (2008). Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb. Pathog.* **45**, 124–133.
- Harel, Y., Silva, M., Giroir, B., Weinberg, A., Cleary, T. B., and Beutler, B. (1993). A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Invest.* **92**, 2110–2116.
- Harmon, B. G., Brown, C. A., Tkalcic, S., Mueller, P. O., Parks, A., Jain, A. V., et al. (1999). Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J. Food Prot.* **62**, 574–9.
- Hausladen, A., Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14100–5.
- Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., García-Ortiz, A., Ibiza, S., Serrador, J. M., and Martínez-Ruiz, A. (2013). Nitrosothiols in the Immune System: Signaling and Protection. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 288–308.
- Herold, S., Paton, J. C., and 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**, 3234–43.
- Hey, C., Boucher, J.-L., Vadon-Le Goff, S., Ketterer, G., Wessler, I., and Racké, K. (1997). Inhibition of arginase N- ω -hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 395–400.
- Hidalgo, E., and Demple, B. (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* **13**, 138–46.
- Hino, T., Nagano, S., Sugimoto, H., Toshi, T., and Shiro, Y. (2012). Molecular structure and function of bacterial nitric oxide reductase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**, 680–687.
- Hoey, D. E. E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C. A., Gally, D. L., and Smith, D. G. E. (2003). Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell. Microbiol.* **5**, 85–97.
- Holloway, S., Senior, D., Roth, L., and Tisher, C. C. (1993). Hemolytic Uremic Syndrome in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **7**, 220–227.
- Hölscher, C., and Rose, S. P. R. (1992). An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci. Lett.* **145**, 165–167.
- Homer, K. L., and Wanstall, J. C. (2002). Inhibition of rat platelet aggregation by the diazeniumdiolate nitric oxide donor MAHMA NONOate. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 1071–81.
- Hsu, C.-N., and Tain, Y.-L. (2019). Regulation of Nitric Oxide Production in the Developmental Programming of Hypertension and Kidney Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 681.
- Huang, J., DeGraves, F. J., Lenz, S. D., Gao, D., Feng, P., Li, D., et al. (2002). The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates Chlamydia-induced disease. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **99**, 3914.
- Hughes, D. T., Clarke, M. B., Yamamoto, K., Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2009). The QseC Adrenergic Signaling Cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog.* **5**.
- Hurley, B. P., Thorpe, C. M., and Acheson, D. W. K. (2001). Shiga Toxin Translocation across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration. *Infect. Immun.* **69**, 6148–6155.
- Hutchings, M. I., Mandhana, N., and Spiro, S. (2002). The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J. Bacteriol.* **184**, 4640–4643.
- Hyduke, D. R., Jarboe, L. R., Tran, L. M., Chou, K. J. Y., and Liao, J. C. (2007). Integrated network analysis identifies nitric oxide response networks and dihydroxyacid dehydratase as a crucial target in *Escherichia coli*. *PNAS* **104**, 8484–8489.
- Ichimura, K., Shimizu, T., Matsumoto, A., Hirai, S., Yokoyama, E., Takeuchi, H., et al. (2017). Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Microbiologyopen* **6**, 1–17.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9265–9.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., et al. (2015). A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.* **22**, 101–7.
- Iida, K.-I., Mizunoe, Y., Wai, S. N., and Yoshida, S.-I. (2001). Type 1 Fimbriation and Its Phase Switching in Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **8**, 489–495.
- Ikeda, M., Ito, S., and Honda, M. (2004). Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. *Pediatr. Nephrol.* **19**, 485–489.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009). Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1764–8.
- Ingledeu, W. J., and Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**, 222–71.
- InVS (2013). Cas groupés d'infections à *E. coli* entérohémorragiques O111 dans une crèche du Morbihan.
- Inward, C. D., Howie, A. J., Fitzpatrick, M. M., Rafaat, F., Milford, D. V., and Taylor, C. M. (1997). Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **11**, 556–559.
- Isabella, V. M., Lapek, J. D., Kennedy, E. M., Clark, V. L., and Clark, V. L. (2009). Functional analysis of NsrR, a nitric oxide-sensing Rrf2 repressor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **71**, 227–39.
- Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Hayashi, S., Kubota, T., Fujii, N., et al. (1998). Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect. Immun.* **66**, 197–202.
- Ito, K., Iida, M., Yamazaki, M., Moriya, K., Moroishi, S., Yatsuyanagi, J., et al. (2007). Intimin Types Determined by Heteroduplex Mobility Assay of Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1038.
- Iyer, R., Williams, C., and Miller, C. (2003). Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 6556–61.
- Janneke Hendriks, Antony Warne, Ulrich Gohlke, Tuomas Haltia, Claudia Ludovici, Mathias

- Lübben, et al. (1998). The Active Site of the Bacterial Nitric Oxide Reductase Is a Dinuclear Iron Center. *Am. Chem. Soc.* **37**, 13102–09.
- Jarvis, K. G., Giron, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7996–8000.
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., et al. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**, 560.
- Jenkins, C., Pearce, M. C., Chart, H., Cheasty, T., Willshaw, G. A., Gunn, G. J., et al. (2002). An eight-month study of a population of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Scottish cattle herd. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 944–53.
- Jeong, K. C., Kang, M. Y., Heimke, C., Shere, J. A., Erol, I., and Kaspar, C. W. (2007). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. *Vet. Microbiol.* **119**, 339–345.
- Jeong, Y. J., Park, S. K., Yoon, S. J., Park, Y. J., and Lee, M. S. (2018). Experimental *in vivo* models of bacterial shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1413–1425.
- Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D., and Kaper, J. B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 7839–43.
- John, M., Kudva, I. T., Griffin, R. W., Dodson, A. W., McManus, B., Krastins, B., et al. (2005). Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infect. Immun.* **73**, 2665–79.
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., and Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **188**, 745–58.
- Jones-Carson, J., Laughlin, J., Hamad, M. A., Stewart, A. L., Voskuil, M. I., and Vázquez-Torres, A. (2008). Inactivation of [Fe-S] Metalloproteins Mediates Nitric Oxide-Dependent Killing of *Burkholderia mallei*. *PLoS One* **3**, e1976.
- Jones, M. L., Ganopolsky, J. G., Labbé, A., Wahl, C., and Prakash, S. (2010). Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 401–407.
- Jost, C., Bidet, P., Carrère, T., Mariani-Kurkdjian, P., and Bonacorsi, S. (2016). Susceptibility of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to azithromycin in France and analysis of resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 1183–1187.
- Jover, B., and Mimran, A. (2001). Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38**, 65–70.
- Ju, W., Shen, J., Toro, M., Zhao, S., and Meng, J. (2013). Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3406–3412.
- Juedes, M. J., and Wogan, G. N. (1996). Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **349**, 51–61.
- Justino, M. C., Almeida, C. C., Teixeira, M., and Saraiva, L. M. (2007). *Escherichia coli* Di-iron YtfE Protein Is Necessary for the Repair of Stress-damaged Iron-Sulfur Clusters. *J. Biol. Chem.* **282**, 10352–10359.

- Justino, M. C., Vicente, J. B., Teixeira, M., and Saraiva, L. M. (2005). New Genes Implicated in the Protection of Anaerobically Grown *Escherichia coli* against Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **280**, 2636–2643.
- Kandell, R. L., and Bernstein, C. (1991). Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: Implications for colon cancer. *Nutr. Cancer* **16**, 227–238.
- Kang, G., Pulimood, A. B., Koshi, R., Hull, A., Acheson, D., Rajan, P., et al. (2001). A Monkey Model for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. *J. Infect. Dis.* **184**, 206–210.
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J., and Blattner, F. R. (2005). Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J. Bacteriol.* **187**, 1135–60.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140.
- Karmali, M. A. (2017). Emerging Public Health Challenges of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Related to Changes in the Pathogen, the Population, and the Environment. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 371–377.
- Karmali, M. A., Gannon, V., and Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* **140**, 360–370.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., et al. (2003). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4930–4940.
- Karmali, M. A., Petric, M., Steele, B. T., and Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*.
- Karpman, D., Andreasson, A., Thysell, H., Kaplan, B. S., and Svanborg, C. (1995). Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr. Nephrol.* **9**, 694–9.
- Keepers, T. R., Psocka, M. A., Gross, L. K., and Obrig, T. G. (2006). A Murine Model of HUS: Shiga Toxin with Lipopolysaccharide Mimics the Renal Damage and Physiologic Response of Human Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 3404–3414.
- Kendall, M. M., Gruber, C. C., Parker, C. T., and Sperandio, V. (2012). Ethanolamine Controls Expression of Genes Encoding Components Involved in Interkingdom Signaling and Virulence in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio* **3**.
- Kerangart, S., Cournoyer, B., and Loukiadis, E. (2018). C-source metabolic profilings of foodborne Shiga-toxin producing *E. coli* match serogroup differentiations and highlight functional adaptations. *Int. J. Food Microbiol.* **266**, 324–336.
- Kern, M., Volz, J., and Simon, J. (2011). The oxidative and nitrosative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome c nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide. *Environ. Microbiol.* **13**, 2478–2494.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P. J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6087–92.
- Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F., Keng, T., DeAngelo, J., et al. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**, 383–96.
- Kim, S. O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (1999). Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction

- to nitrous oxide. *FEBS Lett.* **445**, 389–394.
- King, L. A., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Haeghebaert, S., Weill, F.-X., Baliere, C., et al. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7 via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 1136–1144.
- King, L. A., Mariani-Kurkdjian, P., Gouali, M., and Vaillant, V. (2013). Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2013.
- King, T., Lucchini, S., Hinton, J. C. D., and 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**, 6514–28.
- Klein, E. J., Stapp, J. R., Clausen, C. R., Boster, D. R., Wells, J. G., Qin, X., et al. (2002). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: A prospective point-of-care study. *J. Pediatr.* **141**, 172–1.
- Kleinert, H., Schwarz, P. M., and Förstermann, U. (2003). Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Biol. Chem.* **384**, 1343–64.
- Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J* **298**, 249–258.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., et al. (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* **17**, 2166–76.
- Kokai-Kun, J. F., Melton-Celsa, A. R., and O'Brien, A. D. (2000). Elastase in Intestinal Mucus Enhances the Cytotoxicity of Shiga Toxin Type 2d. *J. Biol. Chem.* **275**, 3713–3721.
- Kolios, G., Valatas, V., and Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* **113**, 427.
- Kolodziejki, P. J., Koo, J.-S., and Eissa, N. T. (2004). Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 18141–18146.
- Konturek, P. C., Brzozowski, T., Sliwowski, Z., Pajdo, R., Stachura, J., Hahn, E. G., et al. (1998). Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**, 691–700.
- Korkmaz, A., Oter, S., Seyrek, M., and Topal, T. (2009). Molecular, genetic and epigenetic pathways of peroxynitrite-induced cellular toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* **2**, 219.
- Kovacs, M. J., Roddy, J., Grégoire, S., Cameron, W., Eidus, L., and Drouin, J. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Med.* **88**, 177–179.
- Kovbasnjuk, O., Edidin, M., and Donowitz, M. (2001). Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. *J. Cell Sci.* **114**, 4025–31.
- Kraft, B., Strous, M., and Tegetmeyer, H. E. (2011). Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* **155**, 104–117.
- Kulasekara, B. R., Jacobs, M., Zhou, Y., Wu, Z., Sims, E., Saenphimmachak, C., et al. (2009). Analysis of the Genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 Spinach-Associated Outbreak Isolate Indicates Candidate Genes That May Enhance Virulence. *Infect. Immun.* **77**, 3713–3721.
- Kurioka, T., Yunou, Y., and Kita, E. (1998). Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect.*

- Immun.* **66**, 1726–34.
- Kwiatkowski, A. V., and Shapleigh, J. P. (1996). Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24382–8.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., and Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6348–6352.
- Lamont, E. A., Xu, W. W., and Sreevatsan, S. (2013). Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics* **14**, 694.
- Landes, M. B., Rajaram, M. V. S., Nguyen, H., and Schlesinger, L. S. (2015). Role for NOD2 in *Mycobacterium tuberculosis*-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 1111–9.
- Lapeyraque, A.-L., Malina, M., Fremeaux-Bacchi, V., Boppel, T., Kirschfink, M., Oualha, M., et al. (2011). Eculizumab in Severe Shiga-Toxin–Associated HUS. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2561–2563.
- Large, T. M., Walk, S. T., and Whittam, T. S. (2005). Variation in Acid Resistance among Shiga Toxin-Producing Clones of Pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2493–2500.
- Lazizzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C., and Kiley, P. J. (1996). DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* **271**, 2762–8.
- Le Bihan, G., Jubelin, G., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Martin, C., Beaudry, F., et al. (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**, 23–33.
- Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., and Choy, J. (2017). “Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase,” in *Macrophages, Results and Problems in Cell Differentiation*, 181–207.
- Leimbach, A., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **358**, 3–32.
- Lemaître, C., Bidet, P., Bingen, E., and Bonacorsi, S. (2012). Transcriptional analysis of the *Escherichia coli* ColV-Ia plasmid pS88 during growth in human serum and urine. *BMC Microbiol.* **12**.
- Levine, M. M., Xu, J. -g., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., et al. (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**, 175–182.
- Lewis, J. P., Yanamandra, S. S., and Anaya-Bergman, C. (2012). HcpR of *Porphyromonas gingivalis* is required for growth under nitrosative stress and survival within host cells. *Infect. Immun.* **80**, 3319–31.
- Lewis, S. B., Cook, V., Tighe, R., and Schüller, S. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium *in vitro* and *ex vivo*. *Infect. Immun.* **83**, 942–949.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., and Hovde, C. J. (2010). A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 5–14.
- Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N., and Foster, J. W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* **62**, 3094–100.
- Lindgren, S. W., Melton, A. R., and O'Brien, A. D. (1993). Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect. Immun.* **61**, 3832–42.
- Lipton, S. A., Gu, Z., and Nakamura, T. (2007). Inflammatory Mediators Leading to Protein Misfolding and Uncompetitive/Fast Off-Rate Drug Therapy for Neurodegenerative Disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 1–27.
- Loś, J. M., Loś, M., Wegrzyn, A., and 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**, 322–329.
- Loukiadis, E., Callon, H., Mazuy-cruchaudet, C., Vallet, V., and Bidaud, C. (2012). Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011).
- Low, A. S., Dziva, F., Torres, A. G., Martinez, J. L., Rosser, T., Naylor, S., et al. (2006). Cloning, Expression, and Characterization of Fimbrial Operon F9 from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **74**, 2233–2244.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Gladwin, M. T. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 156–167.
- Luperchio, S. A., and Schauer, D. B. (2001). Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect.* **3**, 333–40.
- Ma, C., Wickham, M. E., Guttman, J. A., Deng, W., Walker, J., Madsen, K. L., et al. (2006). *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption *in vivo*: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cell. Microbiol.* **8**, 1669–1686.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., and Nathan, C. F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5243–8.
- Macmillan-Crow, L. A., and Cruthirds, D. L. (2001). Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* **34**, 325–336.
- Majlessi, N., Choopani, S., Bozorgmehr, T., and Azizi, Z. (2008). Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **90**, 413–419.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C. H., et al. (1998). Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Derived from Sakai Outbreak. *DNA Res.* **5**, 1–9.
- Mallick, E. M., McBee, M. E., Vanguri, V. K., Melton-Celsa, A. R., Schlieper, K., Karalius, B. J., et al. (2012). A novel murine infection model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **122**, 4012–24.
- Manner, C. K., Nicholson, B., and MacLeod, C. L. (2003). CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes. *J. Neurochem.* **85**, 476–482.
- Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bockaert, J., and Fagni, L. (1992). Nitric Oxide-Induced Blockade of NMDA Receptors. *Neuron* **8**, 653–662.
- Mariani-Kurkdjian, P., Lemaître, C., Bidet, P., Perez, D., Boggini, L., Kwon, T., et al. (2014). Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New microbes new Infect.* **2**, 127–31.
- Matthews, L., Reeve, R., Gally, D. L., Low, J. C., Woolhouse, M. E. J., McAteer, S. P., et al. (2013). Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16265–70.
- Mattila, J. T., and Thomas, A. C. (2014). Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* **5**.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1664–1668.
- McWilliams, B. D., and Torres, A. G. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol. Spectr.* **2**.
- Mellies, J. L., and Lorenzen, E. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Microbiol. Spectr.* **2**.
- Mellion, B., Ignarro, L., Ohlstein, E., Pontecorvo, E., Hyman, A., and Kadowitz, P. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**, 946–955.
- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol. Spectr.* **2**.
- Mermin, J. H., and Griffin, P. M. (1999). Invited Commentary: Public Health in Crisis: Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections in Japan. *Am. J. Epidemiol.* **150**, 797–803.
- Mesa, S., Bedmar, E. J., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H.-M. (2003). *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. *J. Bacteriol.* **185**, 3978–82.
- Messmer, U. K., and Brüne, B. (1996). Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* **319**, 299–305.
- Mills, P. C., Rowley, G., Spiro, S., Hinton, J. C. D., and Richardson, D. J. (2008). A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiology* **154**, 1218–1228.
- Milstien, S., and Katusic, Z. (1999). Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 681–684.
- Mitchell, D. A., and Marletta, M. A. (2005). Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 154–158.
- Mohawk, K. L., Melton-Celsa, A. R., Zangari, T., Carroll, E. E., and O'Brien, A. D. (2010). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microb. Pathog.* **48**, 131–142.
- Monteiro, R., Ageorges, V., Rojas-Lopez, M., Schmidt, H., Weiss, A., Bertin, Y., et al. (2016). A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* (STEC): from enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**.
- Morbidelli, L., Donnini, S., and Ziche, M. (2003). Role of Nitric Oxide in the Modulation of Angiogenesis. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 521–530.
- Mori, M., and Gotoh, T. (2004). Arginine Metabolic Enzymes, Nitric Oxide and Infection. *J. Nutr.* **134**, 2820S-2825S.
- Moxley, R., Francis, D., Tamura, M., Marx, D., Santiago-Mateo, K., and Zhao, M. (2017). Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins (Basel)*. **9**, 49.

- Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L. A., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 745–750.
- Mukhopadhyay, S., and Linstedt, A. D. (2012). Manganese Blocks Intracellular Trafficking of Shiga Toxin and Protects Against Shiga Toxicosis. *Science (80-)*. **335**, 332–335.
- Munns, K. D., Selinger, L. B., Stanford, K., Guan, L., Callaway, T. R., and McAllister, T. A. (2015). Perspectives on Super-Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by Cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**, 89–103.
- Nakano, M. M., Geng, H., Nakano, S., and Kobayashi, K. (2006). The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J. Bacteriol.* **188**, 5878–87.
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051–64.
- Nathan, C., and Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS* **97**, 8841–48.
- Nathan, C., and Xie, Q. (1994). Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915–918.
- Neter, E., Westphal, O., Luderitz, O., Gino, R. M., and Gorzynski, E. A. (1955). Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* **16**, 801–8.
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespit, C. L., Penmant, B. W., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *PNAS* **89**, 3030–3034.
- Nguyen, Y., and Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**.
- Niles, J. C., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* **14**, 109–121.
- Nitschke, M., Sayk, F., Härtel, C., Roseland, R. T., Hauswaldt, S., Steinhoff, J., et al. (2012). Association Between Azithromycin Therapy and Duration of Bacterial Shedding Among Patients With Shiga Toxin–Producing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* **307**, 1046–52.
- Noris, M., and Remuzzi, G. (2005). Hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1035–50.
- Nougayrède, J.-P., Foster, G. H., and Donnenberg, M. S. (2007). Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspF interacts with host protein Abcf2. *Cell. Microbiol.* **9**, 680–693.
- O’Brien, A., Newland, J., Miller, S., Holmes, R., Smith, H., and Formal, S. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science (80-)*. **226**, 694–696.
- Oanh, T. K. N., Nguyen, V. K., De Greve, H., and Goddeeris, B. M. (2012). Protection of Piglets against Edema Disease by Maternal Immunization with Stx2e Toxoid. *Infect. Immun.* **80**, 469–473.
- Obata, F., Tohyama, K., Bonev, A. D., Kolling, G. L., Keepers, T. R., Gross, L. K., et al. (2008). Shiga Toxin 2 Affects the Central Nervous System through Receptor Globotriaosylceramide Localized to Neurons. *J. Infect. Dis.* **198**, 1398–1406.
- Ogden, I., MacRae, M., and Strachan, N. J. C. (2004). Is the prevalence and shedding

- concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 297–300.
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., et al. (2006). Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 2801–2811.
- Ohshima, H., Sawa, T., and Akaike, T. (2006). 8-Nitroguanine, a Product of Nitritative DNA Damage Caused by Reactive Nitrogen Species: Formation, Occurrence, and Implications in Inflammation and Carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1033–1045.
- Oliver Einsle, Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Peter M. H. Kroneck, and Frank Neese* (2002). Mechanism of the Six-Electron Reduction of Nitrite to Ammonia by Cytochrome c Nitrite Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11737–45.
- Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I. D., and Strachan, N. J. C. (2003). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2444–7.
- Ong, K. L., Apostal, M., Comstock, N., Hurd, S., Webb, T. H., Mickelson, S., et al. (2012). Strategies for surveillance of pediatric hemolytic uremic syndrome: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2000–2007. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 424–31.
- Orth, D., Ehrlenbach, S., Brockmeyer, J., Khan, A. B., Huber, G., Karch, H., et al. (2010). EspP, a Serine Protease of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Impairs Complement Activation by Cleaving Complement Factors C3/C3b and C5. *Infect. Immun.* **78**, 4294–4301.
- Otto, A., Biran, D., Sura, T., Becher, D., and Ron, E. Z. (2016). Proteomics of septicemic *Escherichia coli*. *Proteomics Clin. Appl.* **10**, 1020–1024.
- Overton, T. W., Justino, M. C., Li, Y., Baptista, J. M., Melo, A. M. P., Cole, J. A., et al. (2008). Widespread Distribution in Pathogenic Bacteria of Di-Iron Proteins That Repair Oxidative and Nitrosative Damage to Iron-Sulfur Centers. *J. Bacteriol.* **190**, 2004–2013.
- Palermo, M., Alves-Rosa, F., Rubel, C., Fernandez, G. C., Fernandez-Alonso, G., Alberto, F., et al. (2000). Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 77–83.
- Partridge, J. D., Bodenmiller, D. M., Humphrys, M. S., and Spiro, S. (2009). NsrR targets in the *Escherichia coli* genome: new insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Mol. Microbiol.* **73**, 680–694.
- Pathania, R., Navani, N. K., Gardner, A. M., Gardner, P. R., and Dikshit, K. L. (2002). Nitric oxide scavenging and detoxification by the Mycobacterium tuberculosis haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**, 1303–1314.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., and Paton, J. C. (2001). Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. *Infect. Immun.* **69**, 6999–7009.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* **23**, 75–93.
- Peigne, C., Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Plainvert, C., Barbe, V., Médigue, C., et al. (2009). The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect. Immun.* **77**, 2272–84.
- Perna, N. T., Mayhew, G. F., Pósfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., et al. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**, 3810–7.

- Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., et al. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529–533.
- Persad, A. K., and Lejeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Enterohemorrhagic Escherichia coli Other Shiga Toxin-Producing E. coli* **2**, 231–244.
- Persson, S., Olsen, K. E. P., Ethelberg, S., and Scheutz, F. (2007). Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2020–4.
- Pervin, S., Singh, R., and Chaudhuri, G. (2001). Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3583–8.
- Phillips, A. D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., and 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**, 377–81.
- Philpott, D. J., Ackerley, C. A., Kiliaan, A. J., Karmali, M. A., Perdue, M. H., and Sherman, P. M. (1997). Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **273**, 1349–1358.
- Pittman, M. S., Elvers, K. T., Lee, L., Jones, M. A., Poole, R. K., Park, S. F., et al. (2007). Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **63**, 575–590.
- Pohlmann, A., Cramm, R., Schmelz, K., and Friedrich, B. (2000). A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. *Mol. Microbiol.* **38**, 626–638.
- Poljakovic, M., and Persson, K. (2003). Urinary tract infection in iNOS-deficient mice with focus on bacterial sensitivity to nitric oxide. *Am. J. Physiol. Physiol.* **284**, 22–31.
- Poock, S. R., Leach, E. R., Moir, J. W. B., Cole, J. A., and Richardson, D. J. (2002). Respiratory Detoxification of Nitric Oxide by the Cytochrome c Nitrite Reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 23664–23669.
- Poole, R. K., Anjum, M. F., Membrillo-Hernández, J., Kim, S. O., Hughes, M. N., and Stewart, V. (1996). Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**, 5487–5492.
- Price, S. B., Cheng, C. M., Kaspar, C. W., Wright, J. C., DeGraves, F. J., Penfound, T. A., et al. (2000). Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 632–7.
- Pсотка, M. A., Obata, F., Rolling, G. L., Gross, L. K., Ajsaleem, M., Satchell, S. C., et al. (2009). Shiga toxin 2 targets the murine renal collecting duct epithelium. *Infect. Immun.* **77**, 959–969.
- Quirino, I. E. P., Cardoso, V. N., Santos, R. das G. C. dos, Evangelista, W. P., Arantes, R. M. E., Fiúza, J. A., et al. (2013). The Role of L-Arginine and Inducible Nitric Oxide Synthase in Intestinal Permeability and Bacterial Translocation. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **37**, 392–400.
- Raife, T., Friedman, K., and Fenwick, B. (2004). Lepirudin prevents lethal effects of Shiga toxin in a canine model. *Thromb. Haemost.* **92**, 387–393.
- Rajaram, K., and Nelson, D. E. (2015). *Chlamydia muridarum* infection of macrophages elicits bactericidal nitric oxide production via reactive oxygen species and cathepsin B. *Infect. Immun.* **83**, 3164–75.
- Rasooly, R., and Do, P. M. (2010). Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 290–294.

- Rasooly, R., Do, P. M., Griffey, S. M., Vilches-Moure, J. G., and Friedman, M. (2010). Ingested Shiga Toxin 2 (Stx2) Causes Histopathological Changes in Kidney, Spleen, and Thymus Tissues and Mortality in Mice. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9281–9286.
- Reading, N. C., Rasko, D. A., Torres, A. G., and 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.* **106**, 5889–5894.
- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., and Whittam, T. S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**, 64–67.
- Reinstein, S., Fox, J. T., Shi, X., and Nagaraja, T. G. (2007). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Gallbladders of Beef Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1002–1004.
- Rendon, M. A., Saldana, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, 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.* **104**, 10637–10642.
- Richardson, A. R., Dunman, P. M., and Fang, F. C. (2006). The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol. Microbiol.* **61**, 927–939.
- 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. *N. Engl. J. Med.* **308**, 681–685.
- Rinaldo, S., Castiglione, N., Giardina, G., Caruso, M., Arcovito, A., Longa, S. della, et al. (2012). Unusual Heme Binding Properties of the Dissimilative Nitrate Respiration Regulator, a Bacterial Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1178–1189.
- Riquelme-Neira, R., Rivera, A., Sáez, D., Fernández, P., Osorio, G., del Canto, F., et al. (2016). Vaccination with DNA Encoding Truncated Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Factor for Adherence-1 Gene (*efa-1'*) Confers Protective Immunity to Mice Infected with *E. coli* O157:H7. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**.
- Ritchie, J. M. (2014). Animal Models of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. *Microbiol. Spectr.* **2**.
- Ritchie, J. M., Wagner, P. L., Acheson, D. W. K., and Waldor, M. K. (2003). Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1059–66.
- Rivero, M. A., Passucci, J. A., Rodriguez, E. M., and Parma, A. E. (2010). Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *J. Med. Microbiol.* **59**, 345–352.
- Robinson, C. M., Sinclair, J. F., Smith, M. J., and O'Brien, A. D. (2006). Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *PNAS* **103**.
- Rodionov, D. A., Dubchak, I., Arkin, A., Alm, E., and Gelfand, M. S. (2004). Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing delta-proteobacteria. *Genome Biol.* **5**.
- Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J., and Gelfand, M. S. (2005). Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput. Biol.* **1**, 415–431.
- Roering, A. M., Luchansky, J. B., Ihnot, A. M., Ansay, S. E., Kaspar, C. W., and Ingham, S. C. (1999). Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 263–9.

- Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Römling, U., Gross, U., et al. (1998). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol. Microbiol.* **29**, 985–97.
- Rosen, R. C., and Kostis, J. B. (2003). Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **92**, 9–18.
- Rowbury, R. J. (1995). An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and other enterobacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 333–337.
- Roxas, J. L., Wilbur, J. S., Zhang, X., Martinez, G., Vedantam, G., and Viswanathan, V. K. (2012). The Enteropathogenic *Escherichia coli*-Secreted Protein EspZ Inhibits Host Cell Apoptosis. *Infect. Immun.* **80**, 3850–3857.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., et al. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* **269**, 26066–75.
- Russo, T. A., and Johnson, J. R. (2000). Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**, 1753–1754.
- Ryu, J.-H., and Beuchat, L. R. (2005). Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 247–254.
- Sanchez-Villamil, J. I., Tapia, D., and Torres, A. G. (2019). Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *MBio* **10**.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.-B., Skotland, T., and Torgersen, M. L. (2010). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* **56**, 1181–85.
- Sandvig, K., Garred, Ø., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H., and van Deurs, B. (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**, 510–512.
- Santé Publique France (2019). Epidémie de SHU pédiatrique à *E. coli* O26 en France métropolitaine en lien avec la consommation de fromages Saint Marcellin et Saint Félicien : point de situation au 28 mai 2019. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2019/epidemie-de-shu-pediatrique-a-e-coli-o26-en-france-metropolitaine-en-lien-avec-la-consommation-de-fromages-saint-marcellin-et-saint-felicien-poi>.
- Santos, A. S., and Finlay, B. B. (2015). Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cell. Microbiol.* **17**, 318–332.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczek, M., Bugla-Ploskonska, G., et al. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* **11**.
- Sato, T., Hamabata, T., Takita, E., Matsui, T., Sawada, K., Imaoka, T., et al. (2017). Improved porcine model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by deprivation of colostrum feeding in newborn piglets. *Anim. Sci. J.* **88**, 826–831.
- Sauter, K. A. D., Melton-Celsa, A. R., Larkin, K., Troxell, M. L., O'Brien, A. D., and Magun, B. E. (2008). Mouse Model of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by Endotoxin-Free Shiga Toxin 2 (Stx2) and Protection from Lethal Outcome by Anti-Stx2 Antibody. *Infect. Immun.*

- 76, 4469–4478.
- Schairer, D. O., Chouake, J. S., Nosanchuk, J. D., and Friedman, A. J. (2012). The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* **3**, 271–9.
- Scheutz, F., Nielsen, E., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., et al. (2011). Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* **16**.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., et al. (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2951–2963.
- Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* **152**, 687–695.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H., and Karch, H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1205–8.
- Schüller, S. (2011). Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins (Basel)*. **3**, 626–639.
- Schüller, S., Heuschkel, R., Torrente, F., Kaper, J. B., and Phillips, A. D. (2007). Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes Infect.* **9**, 35–39.
- Selvaraj, S. K., and Prasadarao, N. V. (2005). *Escherichia coli* K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-κB activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 544–554.
- Shaikh, N., Holt, N. J., Johnson, J. R., and Tarr, P. I. (2007). *Fim* operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 58–63.
- Shimizu, K., Asahara, T., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Ozawa, A., et al. (2003). Development of a lethal Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infection mouse model using multiple mitomycin C treatment. *Microb. Pathog.* **35**, 1–9.
- Shimizu, T., Matsumoto, A., and Noda, M. (2019). Cooperative roles of NO-metabolizing enzymes to counteract nitrosative stress in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*
- Shimizu, T., Tsutsuki, H., Matsumoto, A., Nakaya, H., and Noda, M. (2012). The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol. Microbiol.* **85**, 492–512.
- Shishehbor, M. H., Aviles, R. J., Brennan, M.-L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G. L., et al. (2003). Association of Nitrotyrosine Levels With Cardiovascular Disease and Modulation by Statin Therapy. *JAMA* **289**, 1675–80.
- Shojaei Jeshvaghani, F., Amani, J., Kazemi, R., Karimi Rahjerdi, A., Jafari, M., Abbasi, S., et al. (2019). Oral immunization with a plant-derived chimeric protein in mice: Toward the development of a multipotent edible vaccine against *E. coli* O157: H7 and ETEC. *Immunobiology* **224**, 262–269.
- Siegler, R. L., Obrug, T. G., Pysker, T. J., Tesh, V. L., Denkers, N. D., and Taylor, F. B. (2003). Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **18**, 92–96.
- Siegler, R. L., Pysker, T. J., Tesh, V. L., and Taylor, F. B. (2001). Response to single and divided doses of Shiga toxin-1 in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1458–67.
- Smith, B. C., and Marletta, M. A. (2012). Mechanisms of S-nitrosothiol formation and

- selectivity in nitric oxide signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 498–506.
- Smith, H. K., Shepherd, M., Monk, C., Green, J., and Poole, R. K. (2011). The NO-responsive hemoglobins of *Campylobacter jejuni*: Concerted responses of two globins to NO and evidence *in vitro* for globin regulation by the transcription factor NssR. *Nitric Oxide* **25**, 234–241.
- Smith, H. W., Green, P., and Parsell, Z. (1983). Vero Cell Toxins in *Escherichia coli* and Related Bacteria: Transfer by Phage and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs. *Microbiology* **129**, 3121–3137.
- Smith, K. E., Wilker, P. R., Reiter, P. L., Hedican, E. B., Bender, J. B., and Hedberg, C. W. (2012). Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157 Infection and the Risk of Hemolytic Uremic Syndrome, Minnesota. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 37–41.
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., and Nesse, L. L. (2013). Biofilm as an Environment for Dissemination of *stx* Genes by Transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 896–900.
- Soum, E., and Drapier, J.-C. (2003). Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the [4Fe-4S] cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 226–232.
- Soysal, N., Mariani-Kurkdjian, P., Smail, Y., Liguori, S., Gouali, M., Loukiadis, E., et al. (2016). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1604–1612.
- Steinert, J. R., Chernova, T., and Forsythe, I. D. (2010). Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *Neurosci.* **16**, 435–452.
- Stentz, R., Weintraub, A., and Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 382–403.
- Stern, A. M., Hay, A. J., Liu, Z., Desland, F. A., Zhang, J., Zhong, Z., et al. (2012). The NorR regulon is critical for *Vibrio cholerae* resistance to nitric oxide and sustained colonization of the intestines. *MBio* **3**.
- Stern, A. M., Liu, B., Bakken, L. R., Shapleigh, J. P., and Zhu, J. (2013). A Novel Protein Protects Bacterial Iron-Dependent Metabolism from Nitric Oxide. *J. Bacteriol.* **195**, 4702.
- Stern, A. M., and Zhu, J. (2014). “An Introduction to Nitric Oxide Sensing and Response in Bacteria,” in *Advances in Applied Microbiology* (Elsevier Inc.), 187–220.
- Stevens, M. P., and Frankel, G. M. (2014). The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **2**.
- Stoffregen, W. C., Pohlenz, J. F. L., and Dean-Nystrom, E. A. (2004). *Escherichia coli* O157:H7 in the Gallbladders of Experimentally Infected Calves. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **16**, 79–83.
- Stolper, D. A., Revsbech, N. P., and Canfield, D. E. (2010). Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18755–60.
- Stuehr, D. J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411**, 217–230.
- Su, L. K., Lu, C. P., Wang, Y., Cao, D. M., Sun, J. H., and 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.* **44**, 54–66.
- Sueyoshi, M., and Nakazawa, M. (1994). Experimental infection of young chicks with attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **62**, 4066–71.
- Suzuki, K., Tateda, K., Matsumoto, T., Gondaira, F., Tsujimoto, S., and Yamaguchi, K. (2000). Effects of interaction between *Escherichia coli* verotoxin and lipopolysaccharide on

- cytokine induction and lethality in mice. *J. Med. Microbiol.* **49**, 905–910.
- Tack, D. M., Marder, E. P., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Hurd, S., et al. (2019). Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **68**, 369–373.
- Tahoun, A., Siszler, G., Spears, K., McAteer, S., Tree, J., Paxton, E., et al. (2011). Comparative Analysis of EspF Variants in Inhibition of *Escherichia coli* Phagocytosis by Macrophages and Inhibition of *E. coli* Translocation through Human- and Bovine-Derived M Cells. *Infect. Immun.* **79**, 4716–4729.
- Takahashi, K., Funata, N., Ikuta, F., and Sato, S. (2008). Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *J. Neuroinflammation* **5**, 11.
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jelacic, S., Habeeb, 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**, 1400–7.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A., and Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**, 1073–1086.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., et al. (2001). *toxB* Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infect. Immun.* **69**, 6660–69.
- Taylor, F. B., Tesh, V. L., DeBault, L., Li, A., Chang, A. C. K., Kosanke, S. D., et al. (1999). Characterization of the Baboon Responses to Shiga-Like Toxin. *Am. J. Pathol.* **154**, 1285–1299.
- te Loo, D. M., Monnens, L., van der Velden, T., Karmali, M., van de Heuvel, L., and van Hinsbergh, V. (2006). Shiga toxin-1 affects nitric oxide production by human glomerular endothelial and mesangial cells. *Pediatr. Nephrol.* **21**, 1815–1823.
- Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolowski, E. A., O’Brien, A. D., et al. (1993). Comparison of the Relative Toxicities of Shiga-Like Toxins Type I and Type II for Mice. *Infect. Immun.* **61**, 3392–3402.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., and Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2512–8.
- Tilden, J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., et al. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* **86**, 1142–5.
- Tinajero-Trejo, M., Vreugdenhil, A., Sedelnikova, S. E., Davidge, K. S., and Poole, R. K. (2013). Nitric oxide reactivities of the two globins of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*: Roles in protection from nitrosative stress and analysis of potential reductants. *Nitric Oxide* **34**, 65–75.
- Tironi-Farinati, C., Loidl, C. F., Boccoli, J., Parma, Y., Fernandez-Miyakawa, M. E., and Goldstein, J. (2010). Intracerebroventricular Shiga toxin 2 increases the expression of its receptor globotriaosylceramide and causes dendritic abnormalities. *J. Neuroimmunol.* **222**, 48–61.
- Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., et al. (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.* **103**, 14941–46.
- Todorovic, S., Justino, M. C., Wellenreuther, G., Hildebrandt, P., Murgida, D. H., Meyer-Klaucke, W., et al. (2008). Iron-sulfur repair YtfE protein from *Escherichia coli*: structural characterization of the di-iron center. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 765–770.

- Toledo, J. C., and Augusto, O. (2012). Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 975–989.
- Torres, A. G., and Kaper, J. B. (2003). Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect. Immun.* **71**, 4985–95.
- 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.
- Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Fioravanti, R., Gally, D., Xu, X., et al. (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**, 3023–3032.
- Tree, J. J., Wolfson, E. B., Wang, D., Roe, A. J., and Gally, D. L. (2009). Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **17**, 361–370.
- Trunk, K., Benkert, B., Quäck, N., Münch, R., Scheer, M., Garbe, J., et al. (2009). Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ. Microbiol.* **12**, 1719–1733.
- Tucker, N. P., D'autréaux, B., Spiro, S., and Dixon, R. (2006). Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 191–194.
- Tucker, N. P., Hicks, M. G., Clarke, T. A., Crack, J. C., Chandra, G., Le Brun, N. E., et al. (2008). The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One* **3**.
- Tucker, N. P., Le Brun, N. E., Dixon, R., and Hutchings, M. I. (2010). There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol.* **18**, 149–156.
- Tucker, N. P., Studholme, D. J., Spiro, S., and Dixon, R. (2004). DNA Binding Activity of the *Escherichia coli* Nitric Oxide Sensor NorR Suggests a Conserved Target Sequence in Diverse Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **186**, 6656–6660.
- Tun, X., Yasukawa, K., and Yamada, K. (2014). Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic. Biol. Med.* **74**, 108–117.
- Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H., Corbin, J. D., Corbin, J. D., Jastorff, B., et al. (1999). Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol. Pharmacol.* **56**, 124–30.
- Tyler, J. S., Beerli, K., Reynolds, J. L., Alteri, C. J., Skinner, K. G., Friedman, J. H., et al. (2013). Prophage Induction Is Enhanced and Required for Renal Disease and Lethality in an EHEC Mouse Model. *PLoS Pathog.* **9**.
- Tyler, J. S., Mills, M. J., and Friedman, D. I. (2004). The operator and Early Promoter Region of the Shiga Toxin Type 2-Encoding Bacteriophage 933W and Control of Toxin Expression. *J. Bacteriol.* **186**, 7670–7679.
- Tzeng, E., Billiar, T. R., Robbins, P. D., Loftus, M., and Stuehr, D. J. (1995). Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11771–5.
- Uhlich, G. A. (2009). KatP contributes to OxyR-regulated hydrogen peroxide resistance in *Escherichia coli* serotype O157 : H7. *Microbiology* **155**, 3589–3598.
- Unno, N., Wang, H., Menconi, M., Tytgat, S., Larkin, V., Smith, M., et al. (1997). Inhibition of

- inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin- induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* **113**, 1246–1257.
- van den Berg, W. A. M., Hagen, W. R., and van Dongen, W. M. A. M. (2000). The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 666–676.
- Van Setten, P. A., Van Hinsbergh, V. W. M., Van Den Heuvel, L. P. W. J., Van Der Velden, T. J. A. N., Van De Kar, N. C. A. J., Krebbers, R. J. M., et al. (1997). Verocytotoxin Inhibits Mitogenesis and Protein Synthesis in Purified Human Glomerular Mesangial Cells Without Affecting Cell Viability: Evidence for Two Distinct Mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1877–1888.
- Vannini, F., Kashfi, K., and Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* **6**, 334–343.
- Vareille, M., De Sablet, T., Hindré, T., Martin, C., and Gobert, A. P. (2007). Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PNAS* **104**, 10199–10204.
- Vareille, M., Rannou, F., Théliier, N., Glasser, A.-L., De Sablet, T., Martin, C., et al. (2008). Heme Oxygenase-1 Is a Critical Regulator of Nitric Oxide Production in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Infected Human Enterocytes. *J. Immunol.* **180**, 5720–5726.
- Volbeda, A., Dodd, E. L., Darnault, C., Crack, J. C., Renoux, O., Hutchings, M. I., et al. (2017). Crystal structures of the NO sensor NsrR reveal how its iron-sulfur cluster modulates DNA binding. *Nat. Commun.* **8**.
- Wadolkowski, E. A., Burris, J. A., and O'Brien, A. D. (1990). Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **58**, 2438–45.
- Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W., Waldor, M. K., and Friedman, D. I. (2001). Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J. Bacteriol.* **183**, 2081–5.
- Waldor, M. K., and Friedman, D. I. (2005). Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 459–465.
- Wales, A. D., Pearson, G. R., Skuse, A. M., Roe, J. M., Hayes, C. M., Cookson, A. L., et al. (2001). Attaching and effacing lesions caused by *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated neonatal lambs. *J. Med. Microbiol.* **50**, 752–758.
- Wan, F., Weaver, A., Gao, X., Bern, M., Hardwidge, P. R., and Lenardo, M. J. (2011). IKK β phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF- κ B function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. *Nat. Immunol.* **12**, 335–343.
- Wang, J., Vine, C. E., Balasiny, B. K., Rizk, J., Bradley, C. L., Tinajero-Trejo, M., et al. (2016). The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **100**, 877–892.
- Wang, W., Kinkel, T., Martens-Habbena, W., Stahl, D. A., Fang, F. C., and Hansen, E. J. (2011). The *Moraxella catarrhalis* Nitric Oxide Reductase Is Essential for Nitric Oxide Detoxification. *J. Bacteriol.* **193**, 2804–2813.
- Warnier, M., Römer, W., Geelen, J., Lesieur, J., Amessou, M., Van Den Heuvel, L., et al. (2006). Trafficking of Shiga toxin/Shiga-like toxin-1 in human glomerular microvascular endothelial cells and human mesangial cells. *Int. Soc. Nephrol.* **70**, 2085–2091.
- Wei, D., Richardson, E. L., Zhu, K., Wang, L., Le, X., He, Y., et al. (2003). Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res.* **63**, 3855–9.
- Wei, X., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G., Huang, F., et al. (1995). Altered immune

- responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**, 408–411.
- Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K., and O'Brien, A. D. (1988). Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* **170**, 4223–4230.
- Weissmann, N., Voswinckel, R., Tadić, A., Hardebusch, T., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., et al. (2000). Nitric Oxide (NO)–Dependent but Not NO-Independent Guanylate Cyclase Activation Attenuates Hypoxic Vasoconstriction in Rabbit Lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 222–7.
- 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.
- Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., et al. (2008). EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **10**, 589–604.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., and Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–9.
- Williams, K. J., Ward, M. P., Dhungyel, O. P., Hall, E. J. S., and Van Breda, L. (2014). A longitudinal study of the prevalence and super-shedding of *Escherichia coli* O157 in dairy heifers. *Vet. Microbiol.* **173**, 101–9.
- Wink, D. A., and Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434–56.
- Wink, D., Kasprzak, K., Maragos, C., Elespuru, R., Misra, M., Dunams, T., et al. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science (80-)*. **254**, 1001–1003.
- Wink, D., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W., and Mitchell, J. B. (1998). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **19**, 711–721.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**, 1136–1151.
- Wong, A. R. C., Clements, A., Raymond, B., Crepin, V. F., and Frankel, G. (2012). The Interplay between the *Escherichia coli* Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Effectors and the Mammalian RhoGEF Inhibitor EspH. *MBio* **3**.
- 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.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldaña, Z., Ledesma, M. A., Puente, J. L., and Girón, J. A. (2009). The type 4 *pili* of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J. Bacteriol.* **191**, 411–21.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Saldaña, Z., Deng, W., Castañeda, E., Freer, E., Tarr, P. I., et al. (2010). Bacterial Macroscopic Rope-like Fibers with Cytopathic and Adhesive Properties. *J. Biol. Chem.* **285**, 32336–42.
- Xu, X., McAteer, S. P., Tree, J. J., Shaw, D. J., Wolfson, E. B. K., Beatson, S. A., et al. (2012). Lysogeny with Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages Represses Type III Secretion in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **8**.
- Xue-han, Z., Qing, Y., Ya-dong, L., Bin, L., Renata, I., and Kong-wang, H. (2013). Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing

- microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1665–1672.
- Yadav, R., Samuni, Y., Abramson, A., Zeltser, R., Casap, N., Kabiraj, T. K., et al. (2014). Pro-oxidative synergic bactericidal effect of NO: kinetics and inhibition by nitroxides. *Free Radic. Biol. Med.* **67**, 248–254.
- Yen, H., Ooka, T., Iguchi, A., Hayashi, T., Sugimoto, N., and Tobe, T. (2010). NleC, a Type III Secretion Protease, Compromises NF- κ B Activation by Targeting p65/RelA. *PLoS Pathog.* **6**.
- Yuk, H.-G., and Marshall, D. L. (2004). Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH Alters Membrane Lipid Composition, Verotoxin Secretion, and Resistance to Simulated Gastric Fluid Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3500–05.
- Yukl, E. T., Elbaz, M. A., Nakano, M. M., and Moënne-Loccoz, P. (2008). Transcription Factor NsrR from *Bacillus subtilis* Senses Nitric Oxide with a 4Fe-4S Cluster. *Biochemistry* **47**, 13084–92.
- Zhang, Q., Donohue-Rolfe, A., Krautz-Peterson, G., Sevo, M., Parry, N., Abeijon, C., et al. (2009). Gnotobiotic Piglet Infection Model for Evaluating the Safe Use of Antibiotics against *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 486–93.
- Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., and Acheson, D. W. K. (2000). Quinolone Antibiotics Induce Shiga Toxin–Encoding Bacteriophages, Toxin Production, and Death in Mice. *J. Infect. Dis.* **181**, 664–670.
- Zhang, Y., Xiao, M., Horiyama, T., Zhang, Y., Li, X., Nishino, K., et al. (2011). The Multidrug Efflux Pump MdtEF Protects against Nitrosative Damage during the Anaerobic Respiration in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **286**, 26576–26584.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J., and Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1290–3.
- Zhao, Y., Cui, A., Wang, F., Wang, X.-J., Chen, X., Jin, M.-L., et al. (2012). Characteristics of pulmonary inflammation in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Chin. Med. J. (Engl.)* **125**, 3015–21.
- Zheng, L., Kelly, C. J., and Colgan, S. P. (2015). Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Physiol.* **309**, 350–360.
- Zhou, X., Yang, W., and Li, J. (2006). Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 31337–47.
- Zotta, E., Lago, N., Ochoa, F., Repetto, H. A., and Ibarra, C. (2008). Development of an experimental hemolytic uremic syndrome in rats. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 559–567.

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) représentent un enjeu majeur en santé publique. En effet, ces pathogènes sont responsables chaque année de milliers de cas de toxi-infections alimentaires à travers le monde et peuvent engendrer des complications graves, notamment des atteintes rénales chez les jeunes enfants et cérébrales chez les personnes âgées. Actuellement, le principal problème réside dans le fait que les traitements thérapeutiques disponibles sont limités puisque l'antibiothérapie peut favoriser le développement des complications liées à l'infection. Il est donc primordial et d'actualité de mettre en évidence les facteurs bactériens associés à la virulence des EHEC et de comprendre les interactions entre le pathogène et l'hôte afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à éliminer le pathogène et limiter l'apparition des symptômes graves. Ainsi, le premier objectif de cette thèse était d'identifier de nouveaux facteurs bactériens potentiellement impliqués dans le processus infectieux. L'utilisation de la technologie RIVET sur la souche de référence O157:H7 EDL933 en modèle murin, a permis de mettre en évidence 31 gènes dont l'expression est spécifiquement induite lors de l'infection. La caractérisation de ces gènes a démontré que certains codent des facteurs de niche qui pourraient accroître le potentiel des souches d'EHEC à s'adapter à l'environnement intestinal et ainsi participer à la virulence du pathogène. Le second volet de cette thèse avait pour but de caractériser *in vivo* la réponse des EHEC au monoxyde d'azote (NO), un médiateur de la réponse immunitaire de l'hôte, et ainsi d'évaluer le potentiel rôle protecteur du NO lors d'une infection en modèle murin. En utilisant une souche d'EHEC rapportant la présence de NO, nous avons démontré que le NO est produit dès les premiers stades de l'infection et que celui-ci limite l'adhésion du pathogène à la muqueuse colique. En revanche, nous avons également mis en évidence un effet néfaste du NO pour l'hôte puisqu'il favorise la production des Shigatoxines (Stx), le facteur de virulence majeur des EHEC, conduisant au développement d'un dysfonctionnement rénal. Enfin, nous avons montré l'importance de la NO réductase NorVW dans la virulence de certaines souches d'EHEC. En effet, l'inactivation de l'opéron *norVW* chez la souche O157:H7 620 réduit la capacité du pathogène à coloniser efficacement le tractus digestif et à produire Stx. Cette observation est toutefois souche dépendante et suggère que la réponse des EHEC au stress nitrosant lors d'une infection est complexe et probablement multifactoriel. L'ensemble de ces travaux contribue à une meilleure compréhension du processus infectieux des EHEC, une étape indispensable au développement de futures stratégies anti-infectieuses.

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are a major public health concern. Indeed, these pathogens are responsible for thousands of food-borne illness cases worldwide every year and can lead to serious complications, including kidney damages in young children and brain damages in the elderly. Currently, the main issue is the limited number of available therapeutic treatments since antibiotic therapy can promote the development of infection-related complications. Therefore, it appears essential and topical to identify bacterial factors associated with EHEC virulence and to understand the interactions occurring between the pathogen and the host, in order to develop new anti-infective strategies. The first objective of this thesis was to identify new bacterial factors potentially involved in the infectious process. Application of the RIVET technology to the reference strain O157:H7 EDL933 revealed 31 genes specifically induced during mouse infection. Characterization of these genes showed that some of them encode niche factors potentially involved in the adaptation of EHEC to the intestinal environment, therefore contributing to virulence. The second aim of this thesis was to characterize *in vivo* the response of EHEC to nitric oxide (NO), a mediator of the host's immune response, and thus assess the protective role of NO against EHEC infection in a mouse model. By using a NO-sensing reporter EHEC strain, we demonstrated that NO is produced by the host at the early stages of infection and this NO limits adhesion of the pathogen to the colonic mucosa. On the other hand, we also showed that NO is detrimental to the host since it promotes the production of Shigatoxins (Stx), which is the major EHEC virulence factor, and leads to the development of renal dysfunction. Finally, we showed that the NO reductase NorVW is important for the virulence of some, but not all, EHEC strains. Inactivation of the *norVW* operon in strain O157:H7 620 reduces the ability of the pathogen to efficiently colonize the digestive tract and to produce Stx. However, this observation is strain-specific and this suggests that EHEC response to nitrosative stress during infection is complex and probably multifactorial. This work contributes to a better understanding of the EHEC infectious process, an essential step for the development of future anti-infective strategies.