



HAL
open science

Pathogénicité des *Escherichia coli* entérohémorragiques: identification de voies de régulation contrôlant la mobilité, la formation de biofilm et le locus d'effacement des entérocytes

Priscilla Branchu

► To cite this version:

Priscilla Branchu. Pathogénicité des *Escherichia coli* entérohémorragiques: identification de voies de régulation contrôlant la mobilité, la formation de biofilm et le locus d'effacement des entérocytes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2012. Français. NNT: . tel-02810885

HAL Id: tel-02810885

<https://hal.inrae.fr/tel-02810885>

Submitted on 6 Jun 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.

Université Blaise Pascal

Université d'Auvergne

Année 2012

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Numéro d'ordre : D. U 2311

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Mention Génétique et Physiologie Moléculaires

(Spécialité : Microbiologie)

Soutenue le 10 décembre 2012

Branchu Priscilla

**Pathogénicité des *Escherichia coli* entérohémorragiques :
identification de voies de régulation contrôlant la mobilité, la
formation de biofilm et le *locus* d'effacement des entérocytes.**

Président : Mme Livrelli Valérie, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

Membres : Mme Norel-Bozouklian Françoise, Chargée de Recherche, Institut Pasteur, Paris.
M Nougayrède Jean-Philippe, Chargé de Recherche, INRA, Toulouse
M Couderc Jean-Louis, Directeur de Recherche, INSERM, Clermont-Ferrand
Mme Martin Christine, Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand-Theix

Rapporteurs : Mme Schouler Catherine, Chargée de Recherche, INRA, Tours
M Dozois Charles, Professeur, Institut Armand Frappier, Canada

Unité de Microbiologie

INRA-C.R. de Clermont-Ferrand Theix

63122 Saint-Genès-Champanelle

Remerciements

Voilà, après 4 années dans l'unité de microbiologie, il est temps pour moi de prendre le large...

Je voudrais tout d'abord remercier Evelyne Forano qui était directrice de l'unité il y a 4 ans. Merci Evelyne de m'avoir accueillie au sein de l'unité. Je souhaite également remercier Régine Talon, directrice adjointe il y a 4 ans et directrice de l'unité actuellement. Merci à toutes les deux d'avoir été disponibles durant ces 4 années.

Je souhaite également dire un grand MERCI à Christine Martin, ma directrice de thèse, pour m'avoir initiée au monde des EHEC, et m'avoir tenu la main tout au long de ces 4 années pour que je puisse désormais marcher seule (ou presque) dans le monde des microbiologistes. Merci pour tous ces conseils techniques et scientifiques, et aussi d'avoir toujours été disponible pour moi... Merci également d'avoir toujours su trouver les mots justes qui m'ont permis de mener à bien mes travaux malgré les nombreuses embûches qui ont eu lieu durant ces 4 années...

Je souhaite également remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Tout d'abord, je remercie le Professeur Valérie Livrelli de me faire l'honneur de présider ce jury. Ensuite, je remercie le Professeur Charles Dozois et le Docteur Catherine Schouler d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Docteur Françoise Norel-Bozouklian, le Docteur Jean-Philippe Nougayrède ainsi que le Docteur Jean-Louis Couderc de faire partie des membres de ce jury.

Je souhaite ensuite remercier tous les anciens de l'équipe « patho », merci Alain, merci Maurice qui est désormais à la retraite, merci Yolande... Un grand merci également à Grégory pour tes conseils, et d'être resté calme avec le boulet lors de la session ski...

Je souhaite remercier particulièrement Annie, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions climatiques assez extrêmes (si si, aussi chaud en plein milieu de l'Auvergne c'est possible...). Je te remercie aussi pour ton soutien aussi bien moral que technique, et d'avoir écouté mes nombreuses théories que je t'expliquais sur le tableau blanc du labo 203...

Je ne peux remercier Annie sans remercier Alex, avec qui travailler a toujours été un plaisir. Merci aussi pour ta bonne humeur permanente, et de m'avoir initiée aux jeux concours grâce auxquels nous avons partagé des soirées concert qui m'ont permis de me détendre lors de ces 4 années...

Je remercie désormais Annick, qui est maintenant notre chef d'équipe. Merci pour ton oreille attentive et pour tes conseils tout au long de ma thèse. Merci également pour tes judicieux conseils vestimentaires, notamment pour le congrès INRA-ROWETT à Aberdeen (je n'en dirai pas plus, promis)...

Je souhaiterais maintenant remercier Larueen (non non ce n'est pas une faute de frappe...) avec qui j'ai partagé mon bureau lors de nos rédactions de thèse. Merci de m'avoir supportée pendant ces 4 ans, et d'avoir formé ce duo de choc « la blonde et la brune »... A qui vais-je faire mes blagues maintenant ???

Je remercie également Sophie, pour son oreille attentive, Eeeeeeee pour sa patience, Pascale L pour sa culture et ses conseils, Fohet pour sa bonne humeur permanente, Coco pour son dynamisme, Jordane la relève des thésardes ainsi que tous ceux de l'ancienne équipe

« EcoDig » : Fred C mon ancienne voisine de bureau, Pascale M, Fred F et Chloé, Gégé, Gloria...

Je souhaite également remercier « la famille de l'INRA » (ils comprendront) : Pierre, Célia, Sandra, Caro, Marie, Aurore et Carine. Merci à vous pour les moments « détente »... Je souhaite également remercier ceux de l'ancienne équipe QuaSA : Sabine pour sa gentillesse et ses conseils, Michel, Mickaël pour ses talents artistiques sur mes jolis posters, Ingrid pour sa disponibilité et ses talents artistiques également, mais aussi Nelly, Yvette, Brigitte D désormais à la retraite, Sylvie, Jean-Paul, Isabelle...

Merci à l' « annexe microbio », Gégé Vert, Christophe de Martrin, Christophe del'Homme et Valérie...

Un grand merci à notre secrétaire, Steph, pour sa bonne humeur et sa disponibilité... Merci à toi pour les moments footing également, où tu m'as toujours semée...

Ensuite, je remercie le deuxième « Alex » du labo : Alexandre !!! Pour ta sympathie, même si tu n'es pas au mieux de ta forme dans ce rude climat Auvergnat... T'inquiètes pas, on te pardonne, on ne peut pas tous être parfaits...

Et bien sûr je n'oublie pas de remercier Cathy, toujours souriante quoi qu'il arrive et qui sait remotiver les troupes et prendre soin de tous... Reste comme tu es !!!

Je remercie également les stagiaires qui ont fait partie de ma vie de thésarde... Audrey (Mauricette...) qui est devenue une amie !! Gaétan (qui arrivait à attraper des choses que je n'arrivais même pas à toucher en étant sur un plot et sur la pointe des pieds), Guy avec sa vie à l'heure africaine « no stress »... Juliette, pour sa bonne humeur et son dynamisme !!! Et Dimitry, le sportif-intello avec qui j'ai partagé des discussions très intéressantes aussi bien sur des sujets scientifiques que sportifs. Chacun d'entre vous m'a beaucoup apporté...

Je souhaite également remercier mes amis, sans lesquels ces 4 années auraient été moins roses. Merci à Jerem et Tatiana qui ont partagé notre quotidien durant quelques semaines à la fac, un grand merci à Julie qui a partagé mes premiers pas à la fac et qui continue d'être là dans les bons et les mauvais moments, merci également à Benoit et Emilie, Eric et Elodie, pour les soirées partagées en votre compagnie au bord du lac d'Aydat ou encore à Clermont. Merci également à Nina, ma cousine d'adoption, à Loïc qui partage désormais sa vie, à Vaness et Gwen. Merci à vous quatre pour les moments partagés et pour les soirées imprévues ou pas, pendant lesquelles on a bien ri... Je souhaite aussi remercier mes amis de fac qui n'ont pas poursuivi en thèse mais qui sont toujours présents dans ma vie, je pense à ma élo et son chéri Stef (ou « Daren »), à Amandine et Seb qui sont désormais loin de Clermont-Ferrand malheureusement, à Flo (ou « moumoune ») le doyen de notre bande... Un grand merci également à tous les thésards, Mylène, Loulou, Lucie, Nico, Steph', anciens thésards, Benjamin, et leur compère, Emilie... « Une partie de pétanque, ça fait plaisir »... Enfin, merci à mes amis qui me supportent depuis bien plus longtemps et qui sont toujours là... Notamment, un grand merci à Marie (ou Madou)... Et merci aussi à tous ceux que je n'ai pas cités...

Ensuite, je souhaite remercier ma famille qui m'a toujours soutenue. Merci Maman, merci Tatie Malou, Tatie Fta... Merci Papa et Danielle, merci Joël et Geneviève... Je remercie également tous les autres membres de la famille, une page serait bien trop courte pour exprimer tout ce que j'aimerais...

Enfin, je souhaite remercier Bruno. Merci d'avoir été présent tout au long de cette thèse et de m'avoir supportée jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire, ce qui n'est pas une mince affaire je le conçois... Et pourtant, quelle présence indispensable. Merci d'être là pour moi...

Pour tous ceux qui se demandent encore pourquoi ma paillasse n'était que très rarement « rangée » :

C'est parce que comme l'a écrit Jean Echenoz :

« C'est ainsi que naissent les grandes inventions : par le contact inopiné de deux produits posés par hasard, l'un à côté de l'autre, sur une paillasse de laboratoire »... Alors j'essaie tous les jours de faire naître une grande invention... Qui sait, un jour peut-être...

Sommaire

Sommaire	7
Liste des Abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	21
Résumé	23
Abstract	23
Revue de littérature	25
1. Les Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC) :.....	27
1.1. Généralités sur les E. coli pathogènes intestinaux	27
1.2. Classification des STEC	29
1.1.1. Classification antigénique des STEC.....	29
1.1.2. Les différents séropathotypes	29
1.1.3. Classement phylogénétique	30
Phylogénie des E. coli.....	30
Origine et phylogénie des EHEC	31
1.3. Réservoirs et vecteurs	31
1.4. Aspects cliniques- Symptômes- Traitements	35
1.4.1. Symptomatologie	35
1.4.2. Diagnostic	36
1.4.3. Traitements.....	36
1.5. EHEC- épidémies	37
1.5.1. Dans le monde	37
Première épidémie à EHEC :	37
Epidémies mondiales de grande ampleur :	38
1.5.2. En France :	39
En 2005 :	39
En 2011 :	39
2. Physiopathologie.....	40
2.1. La résistance à l'acidité gastrique	40
2.2. L'adhésion à l'épithélium intestinal et les perturbations du cytosquelette	44
2.2.1. Les lésions d'attachement et d'effacement des entérocytes	44
2.2.2. Régulation du LEE et du SSTT	49
Régulation par H-NS	49

Régulation par Ler (LEE encoded regulator)	49
Régulation par GrlA/R (Global Regulator LEE Activator and Repressor)	50
Régulation par les protéines Pch	51
Régulation par le Quorum Sensing	51
Régulation par Hfq	52
Régulation par GadE et YhiF	53
Les autres régulateurs de l'expression du LEE	53
Conclusions sur la régulation de l'expression des gènes du LEE	54
2.3. La production de Shiga toxines	54
3. Le monoxyde d'azote	56
3.1. Généralités	56
3.2. Synthèse du NO par les cellules eucaryotes.....	58
3.2.1. Régulation de l'expression de la iNOS	58
3.2.2. Modulation de la production de NO par la L-arginine	60
3.3. Principales fonctions physiologiques du NO	61
3.4. La réponse bactérienne au NO	61
3.4.1. Les systèmes de détoxification du NO	62
La cytochrome c nitrite réductase.....	62
La flavohémoglobine	62
La flavorubrédoxine	63
3.4.2. Les protéines régulatrices de la dénitrification du NO	63
NorR	64
NsrR.....	65
3.4.3. Dialogue moléculaire spécifique hôte-EHEC	68
4. Le di-GMP cyclique.....	69
4.1. Généralités	69
4.2. Le contrôle de la concentration intracellulaire en di-GMPc.....	70
4.2.1. Synthèse et dégradation du di-GMPc	70
4.2.2. Structure des enzymes impliquées dans le métabolisme du di-GMPc.....	71
Domaine catalytique des DGC.....	71
Domaine catalytique des PDE	72
Les protéines à domaines GGDEF et EAL	73
Environnement protéique.....	74
Fréquence des DGC et PDE	74
Les protéines à domaine GGDEF ou EAL dégénéré	75
4.2.3. Régulation de l'expression et/ou de l'activité des DGC et des PDE	76

Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	76
Régulation post-traductionnelle	77
Conclusion sur la régulation de l'expression et/ou l'activité des DGC et PDE	78
4.3. Rôle du di-GMPc chez les bactéries.....	79
4.3.1. Signaux transduits par le di-GMPc.....	79
4.3.2. Mécanismes d'action du di-GMPc/ cibles du di-GMPc.....	80
4.3.3. Processus cellulaires affectés par le di-GMPc	81
La production de cellulose :	81
La mobilité bactérienne :	82
La formation de biofilm :	84
La production de l'exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) :	85
Conclusion sur les différents processus affectés par le di-GMPc	86
4.3.4. Le di-GMPc et les mécanismes de virulence	86
4.3.5. Le di-GMPc chez les <i>E. coli</i> K-12.....	87
4.4. Dialogue moléculaire hôte-pathogène via le NO et le di-GMPc.....	90
Objectifs du travail de thèse.....	93
Chapitre I : Régulation de l'expression du LEE.....	97
Introduction.....	99
Matériels et Méthodes.....	101
Souches et plasmides utilisés.....	101
Construction des mutants isogéniques.....	101
Construction des plasmides pour les complémentations	102
Résistance à l'acidité.....	102
Milieux et conditions de culture	102
Extraction de l'ADN génomique des EHEC	103
Extraction des ARN totaux.....	103
Transcription inverse des ARNm	103
PCR quantitative en temps réel	104
Obtention des courbes standards	104
Quantification des ADNc.....	104
Western-blot	105
Préparation et analyse des protéines du SSTT dans les surnageants de culture	105
Détection des protéines.....	105
Retard sur gel.....	106
Obtention des protéines GadE et GadX purifiées	106

Expériences de retard sur gel.....	106
Immunoprécipitation de la chromatine.....	108
Résultats.....	111
1. Organisation de l'opéron du LEE	111
2. Confirmation des résultats d'analyse transcriptomique par qRT-PCR.....	111
3. Construction des différents mutants nécessaires à l'étude et complémentation	112
Courbes de croissance des différentes souches	112
Résistance à l'acidité des souches $\Delta gadE(pgadE)$ et $\Delta gadX(pgadX)$	113
4. Rôle de Ler dans la régulation de l'expression du LEE, de <i>gadE</i> et de <i>gadX</i> par le NO.....	113
Analyse transcriptionnelle	113
Analyse fonctionnelle	115
5. Rôle de GadE dans la régulation de l'expression du LEE et de <i>gadX</i> par le NO.....	118
Analyse transcriptionnelle	118
Analyse fonctionnelle	119
Rôle de GadE dans la sécrétion des protéines effectrices.....	124
6. Rôle du régulateur GadX dans la régulation de l'expression du LEE et de <i>gadE</i> par le NO	125
Analyse transcriptionnelle	125
Analyse fonctionnelle	127
Rôle de GadX dans la sécrétion des protéines effectrices.....	130
7. GadE et GadX sont-ils épistatiques pour la régulation de l'expression du LEE ?.....	130
Analyse transcriptionnelle	130
8. Conclusion sur la régulation du LEE, de <i>gadE</i> et de <i>gadX</i> par le NO	132
9. Rôle de NsrR dans la régulation du LEE, de <i>gadE</i> et de <i>gadX</i> par le NO	132
Analyse transcriptionnelle	132
Analyse fonctionnelle	134
Rôle de NsrR dans la sécrétion des protéines effectrices	137
10. Modèle de régulation du LEE	138
Discussion et perspectives	141
Chapitre II : rôle du di-GMPc chez la souche EHEC O157:H7 EDL933.....	147
Introduction.....	149
Matériels et Méthodes.....	152
Souches et plasmides utilisés.....	152
Construction des différents mutants.....	152
Construction des plasmides pour les complémentations	153
Milieux et conditions de culture	153

Extraction de l'ADN génomique des EHEC/ Extraction des ARN totaux/ Transcription inverse des ARNm/ PCR quantitative en temps réel	153
Activité phosphodiesterase <i>in vitro</i>	153
Dosage du di-GMPc intracellulaire	153
Tests de mobilité.....	154
Formation de biofilm.....	154
Colonisation de l'intestin de souris par les EHEC.....	154
Résultats.....	155
1. Caractérisation de VmpA	155
Activité phosphodiesterase <i>in vitro</i> de VmpA	155
Analyse transcriptionnelle de <i>vmpA</i>	155
Analyse phénotypique du mutant $\Delta vmpA::km$	157
2. Complémentation du mutant EDL933 $\Delta vmpA$	171
Complémentation en <i>trans</i>	171
Complémentation chromosomique (en <i>cis</i>)	173
Complémentation par échange d'allèle (en <i>cis</i>)	176
Conclusion sur la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$	177
Analyse phénotypique du mutant transposon	177
Conclusions sur la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$	180
3. Analyse du mutant $\Delta vmpA::cat$	181
Croissance du mutant $\Delta vmpA::cat$	181
Complémentation du mutant $\Delta vmpA::cat$	181
Analyse phénotypique	182
Discussion et Perspectives	187
Discussion générale.....	193
Liste des publications et communications.....	199
1. Publications.....	201
Sur le travail de thèse.....	201
Sur le travail de master I.....	201
2. Communications.....	201
Communications orales	201
Communications affichées.....	202
Conférence sur invitation	202
Références bibliographiques	203

Publications 229
Publication n°1..... 231
Publication n°2..... 233

Liste des Abréviations

A/E : Attachement et effacement
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIEC : Adherent-invasive *E. coli*
AI : Auto-inducteur
AFI : Acid fitness island
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
CAT : Cationic amino-acid transporter
CFU : Colony-forming unit
DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse
DGC : Diguanilate cyclase
Di-GMPc : Diguanosine monophosphate cyclique
DO : Densité optique
DRO : Dérivés réactif de l'oxygène
DTT : Dithiothréitol
Eae : *E. coli* attaching and effacing
EAEC : *E. coli* entéroagréatif
EHEC : *E. coli* entérohémorragique
EIEC : *E. coli* entéroinvasifs
eNOS : NOS endothéliale
EPEC : *E. coli* entéropathogène
ETEC : *E. coli* entérotoxigénique
ExPEC : *E. coli* extra-intestinaux
Esp : *E. coli* secreted proteins
FIRd : Flavorubédoxine
Fnr : Fumarate nitrate réduction
GABA : γ -aminobutyrate
GAD : Glutamate décarboxylase
Gb3 : Globotriosyl céramide 3
GMPc : Guanosine mono phosphate
GrlA/R : Global regulator LEE activator and repressor
GTP : Guanosine triphosphate
Hmp : Flavohémoglobine
HTH : Hélice-tour-hélice
iNOS : NOS inductible
LEE : Locus d'effacement des entérocytes
Ler : LEE encoded regulator

LPS : Lipopolysaccharide
MC : Mitomycine C
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
Nnr : Nitrate reductase regulator
NsrR : NO₂⁻-responsive regulator
NO : Monoxyde d'azote
NO⁺ : Cation nitrosium
NO⁻ : Anion nitrosyl
NODs : NO dioxygénases
NorR : NO responsive regulator
NORs : NO réductases
NOS : NO Synthases
nNOS : NOS neuronales
N₂O₃ : Trioxyde d'azote
NrfA : cytochrome *c* réductase
OAT : Ornithine aminotransférase
ODC : Ornithine décarboxylase
ONOO⁻ : Peroxynitrite
ORF : Open reading frame
Pch : PerC homologue
PCR : Polymérase chain reaction
PDE: Phosphodiesterase
Per : Plasmid encoded regulator
PNAG : Poly-N-acetylglucosamine
PTT: Purpura thrombotique thrombocytopenique
QseA : Quorum sensing *E. coli* regulator A
SHU: Syndrôme hémolytique et urémique
SSTT: Système de secretion de type trois
STEC : *E. coli* producteurs de shiga toxine
Stx : Shiga toxine
Tir : Translocated intimin receptor
UPEC : *E. coli* uropathogène
Wt: Wild type (souche sauvage)

Liste des figures

Figure 1: Modes de colonisation schématiques des différents pathovars d' <i>E. coli</i> intestinaux..	28
Figure 2: Structure du tube digestif du bovin.	32
Figure 3 : Modes de contamination aux STEC des différents produits de la chaîne alimentaire.	34
Figure 4: Evolution clinique après l'ingestion des EHEC.	35
Figure 5 : Système de résistance à l'acidité dépendant du glutamate.	41
Figure 6 : Acid Fitness Island de la souche <i>E. coli</i> K-12 MG1655 et de la souche EHEC O157:H7 EDL933..	41
Figure 7 : Lésions d'attachement et d'effacement induites par une souche d'EHEC O157:H7 sur des cellules épithéliales rectales de mouton.	45
Figure 8 : Locus d'effacement des entérocytes (LEE) des EHEC	45
Figure 9 : Structure du système de sécrétion de type III chez les EHEC.	46
Figure 10 : Structure de la liaison Eae-Tir à l'origine de l'attachement intime entre les EHEC et les entérocytes.	47
Figure 11 : Fonction des différentes protéines sécrétées par les EHEC au sein de la cellule hôte.	48
Figure 12 : Activation de l'expression du LEE dans l'intestin par les AIs sécrétés par le microbiote intestinal et les neurones afférents au tube digestif.	52
Figure 13 : Mécanisme d'entrée de la Stx dans le système sanguin.	55
Figure 14 : Principales propriétés chimiques et biochimiques du NO, ainsi que les principales fonctions physiologiques touchées.	57
Figure 15 : Synthèse enzymatique de NO.	58
Figure 16 : Modulation de la production de NO durant l'inflammation.	59
Figure 17 : Métabolisme cellulaire de l'arginine.	60
Figure 18 : Système de détoxification du NO chez les <i>Escherichia coli</i> .	62
Figure 19 : Séquence consensus de fixation de NsrR.	65
Figure 20 : Modèle de répression par NsrR.	66
Figure 21: Modèle d'inhibition de la production de Stx par le NO	69
Figure 22 : Structure de la molécule di-guanosine monophosphate cyclique..	70
Figure 23: Métabolisme du di-GMPc..	71

Figure 24: Représentation schématique de l'activité diguanylate cyclase des protéines à domaine GGDEF.....	72
Figure 25 : Facteurs environnementaux transduits par le di-GMPc et mécanismes physiologiques régulés en conséquence.....	80
Figure 26 : Régulation de la mobilité et de la formation de biofilm chez <i>E. coli</i> K-12.....	83
Figure 27 : Dialogue hôte-pathogène <i>via</i> le NO et le di-GMPc.....	91
Figure 28 : Représentation schématique des différentes régions promotrices amplifiées pour les retards sur gel et les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.....	107
Figure 29 : Principe de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine.....	108
Figure 30 : Organisation des différents opérons du LEE et gènes principaux codés par chacun d'entre eux.....	111
Figure 31 : Quantification des ARNm de différents gènes du LEE et de <i>gadE</i> et <i>gadX</i>	112
Figure 32 : Courbes de croissance des différentes souches utilisées pour l'étude.....	112
Figure 33 : Résistance à l'acidité dans la souche sauvage de référence EDL933, dans les mutants $\Delta gadE$ et $\Delta gadX$, et dans les mutants complémentés $\Delta gadE(pgadE)$ et $\Delta gadX(pgadX)$	113
Figure 34 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE.....	114
Figure 35 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec Ler étiqueté poly-histidine.....	117
Figure 36 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de <i>gadX</i> et <i>gadE</i> immunoprécipitées avec Ler étiqueté poly-histidine.....	117
Figure 37 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE.....	118
Figure 38 : Western-blot effectué sur les produits de purification de la protéine GadE-6His.....	120
Figure 39 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de <i>gadA</i>	120
Figure 40 : Retard sur gel de polyacrylamide des deux régions promotrices de <i>ler</i>	121
Figure 41 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de <i>espA</i>	122
Figure 42 : Retard sur gel de polyacrylamide des régions promotrices tirP1, tirP2 et tirP3.....	122
Figure 43 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de <i>gadX</i> et <i>gadE</i> immunoprécipitées avec GadE étiqueté poly-histidine.....	123
Figure 44 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec GadE étiqueté poly-histidine.....	124
Figure 45 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture.....	125
Figure 46 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE.....	126

Figure 47 : Western-blot effectué sur les produits de purification de la protéine 6His-GadX	127
Figure 48 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de <i>gadA</i>	128
Figure 49 : Retard sur gel de polyacrylamide des régions promotrices lerP2, espA, tirP1, tirP2 et tirP3	128
Figure 50 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de <i>gadA</i> et <i>gadE</i> immunoprécipitées avec GadX étiqueté poly-histidine.....	129
Figure 51 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec GadX étiqueté poly-histidine.....	129
Figure 52 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture	130
Figure 53 : Nombre de transcrits des différents gènes du LEE.	131
Figure 54 : Représentation schématique de la régulation du LEE par Ler, GadE et GadX.	132
Figure 55 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE	133
Figure 56 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de <i>gadE</i> , <i>gadX</i> et <i>hmpA</i> immunoprécipitées avec NsrR étiqueté poly-histidine.....	134
Figure 57 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4, LEE5 et de <i>hmpA</i> immunoprécipitées avec NsrR étiqueté poly-histidines.....	135
Figure 58 : Alignement de la séquence consensus de fixation de NsrR avec les séquences promotrices de LEE1, LEE4 et LEE5.	136
Figure 59 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture	137
Figure 60 : Modèle de régulation du LEE par Ler, GadE, GadX et NsrR en absence de NO.	138
Figure 61 : Modèle de régulation du LEE par Ler, GadE, GadX et NsrR en présence de NO.	139
Figure 62 : Expression de <i>yhiF</i> dans la souche sauvage EDL933, dans le mutant $\Delta gadE$ et le mutant complémenté $\Delta gadE(pgadE)$	143
Figure 63 : Modèle hypothétique de la régulation du LEE par GadE et YhiF.	144
Figure 64 : Alignement de la séquence protéique de VmpA avec les phosphodiesterases fonctionnelles PdeA1 de l'espèce <i>Gluconacetobacter xylinus</i> et VieA de <i>Vibrio cholerae</i> ..	149
Figure 65 : Comparaison de l'organisation génomique de la souche <i>E. coli</i> K-12 MG1655 et de la souche EHEC EDL933	150
Figure 66 : Résultats de l'analyse transcriptomique effectuée dans le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$ comparé à la souche sauvage EDL933.	150
Figure 67 : Quantité de di-GMPc hydrolysée par VmpA au cours du temps.	155
Figure 68 : Organisation transcriptionnelle de <i>ycdT</i> et <i>vmpA</i>	156
Figure 69 : Expression de <i>vmpA</i> en début de phase exponentielle (DO 0.4) et en phase exponentielle tardive (DO 1) de croissance	157
Figure 70 : Courbes de croissance en milieu LB de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$	157

Figure 71 : Courbes de croissance en milieu EG pH 5 de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$	158
Figure 72 : Courbes de croissance en milieu EG pH 7 de la souche sauvage EDL933 et du mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$	158
Figure 73 : Expression relative du gène <i>z1530</i> dans la souche sauvage et le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$	159
Figure 74 : Concentration intracellulaire en di-GMPc de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$	160
Figure 75 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933 et du mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$	160
Figure 76 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933 et le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$	161
Figure 77 : Expression du gène <i>gadE</i> dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant $\Delta gadX$ et le mutant Δler	162
Figure 78 : Expression du gène <i>gadX</i> dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$ et le mutant Δler	163
Figure 79 : Expression du gène <i>ler</i> dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$ et le mutant $\Delta gadX$	164
Figure 80 : Expression du gène <i>espA</i> dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$, le mutant $\Delta gadX$ et le mutant Δler	165
Figure 81 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA (pH 5, phase exponentielle précoce).....	166
Figure 82 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA (pH 5, phase exponentielle tardive).....	167
Figure 83 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA (pH 7, phase exponentielle précoce).....	168
Figure 84 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA (pH 7, phase exponentielle tardive).....	169
Figure 85 : Colonisation intestinale des souris traitées à la streptomycine.	170
Figure 86 : Courbes de croissance de la souche Top10(p33 <i>vmpA</i>)	171
Figure 87 : Nombre de transcrits du gène <i>vmpA</i> dans la souche <i>E. coli</i> K-12 (Top10) hébergeant le plasmide p33 <i>vmpA</i>	172
Figure 88 : Concentration en di-GMPc dans la souche <i>E. coli</i> K-12 transformée avec le plasmide recombinant p33 <i>vmpA</i> ou le plasmide vide (pBAD33)	173
Figure 89 : Schéma de l'intégration chromosomique du plasmide recombinant pKO3' <i>ycdTvmpA</i> pour la complémentation en <i>cis</i> du mutant $\Delta vmpA::km$	174
Figure 90 : Expression de <i>vmpA</i> dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta vmpA::km$ complémenté en <i>cis</i> , $\Delta vmpA::kmC$	174
Figure 91 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant $\Delta vmpA::kmC$	175
Figure 92 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant complémenté $\Delta vmpA::kmC$ (n=7).....	175
Figure 93 : Expression des gènes <i>ler</i> et <i>gadE</i> dans la souche EDL933, le mutant $\Delta vmpA$ et le mutant complémenté $\Delta vmpA::kmC$	176
Figure 94 : Représentation schématique de la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$ par échange allélique.	176

Figure 95 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, du mutant $\Delta vmpA::km$ et des deux mutants complétés $\Delta vmpA::vmpA-cat$ 1 et 2.....	177
Figure 96 : Courbes de croissance en milieu LB de la souche sauvage EDL933 et du mutant 115B5.	178
Figure 97 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933 et du mutant 115B5	178
Figure 98 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933 et le mutant 115B5	179
Figure 99 : Expression du gène <i>vmpA</i> dans les souches EDL933, EDL933 (p30 <i>vmpA</i>) et le mutant complété 115B5(p30 <i>vmpA</i>).....	179
Figure 100 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, du mutant 115B5 et du mutant 115B5(p30 <i>vmpA</i>)	180
Figure 101 : Courbes de croissance de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::cat$	181
Figure 102 : Mobilité bactérienne des différentes souches	182
Figure 103 : Formation de biofilm par les différentes souches	183
Figure 104 : Expression relative du gène <i>ler</i> dans les différentes souches	184
Figure 105 : Expression relative du gène <i>espA</i> dans les différentes souches	184

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sérogroupes d'EHEC les plus fréquents	29
Tableau 2 : Classification des STEC en fonction de la fréquence d'isolement lors d'épidémies ainsi que de la sévérité de la pathologie engendrée.	30
Tableau 3 : Les différentes souches qui possèdent des gènes homologues aux gènes <i>psrA</i> et <i>psrB</i> de la souche d'EHEC O157:H7 EDL933.	43
Tableau 4 : Gènes dont l'expression est régulée par NsrR chez <i>E. coli</i> souche MG1655.	67
Tableau 5 : Nombre des protéines à domaine GGDEF, EAL et HD-GYP chez différentes espèces bactériennes.	74
Tableau 6 : Récapitulatif des gènes impliqués dans le métabolisme du di-GMPc régulés lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance par σ^S .	77
Tableau 7 : Liste des protéines DGC ou PDE chez <i>E. coli</i> dont l'activité et le rôle dans la physiologie bactérienne a été décrit.	88
Tableau 8 : Protéines dont la transcription du gène est altérée par une augmentation de la concentration en di-GMPc.	90
Tableau 9 : Souches et plasmides utilisés	101
Tableau 10 : Différents anticorps utilisés pour les Western-blot	105
Tableau 11 : Nom et région correspondante des différents fragments amplifiés en qPCR pour l'analyse des immunoprécipitations de la chromatine.	116
Tableau 12 : Souches et plasmides utilisés pour l'étude.	152

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxi-infections alimentaires conduisant à des colites hémorragiques pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique. Une fois arrivés dans l'intestin, les EHEC adhèrent aux cellules épithéliales en causant des lésions d'attachement-effacement. Le système de sécrétion de type III et les protéines effectrices requis pour ce phénotype sont codés majoritairement par le *locus* d'effacement des entérocytes (LEE), constitué de plusieurs opérons (LEE1-5). Notre étude a permis de clarifier une des cascades de régulation contrôlant l'expression du LEE. Par des analyses en qRT-PCR et des immuno-précipitations de la chromatine, nous avons déterminé que les régulateurs GadE et GadX sont des répresseurs indirects de l'expression du LEE. GadE active l'expression de *gadX*, et GadX réprime l'expression de *ler*, codant pour le principal activateur des opérons LEE2-5. De plus, GadE réprime aussi l'expression des opérons LEE4 et LEE5 indépendamment de Ler. En retour, Ler réprime l'expression de *gadE* et de *gadX*.

Le monoxyde d'azote (NO) est un effecteur majeur de la réponse immune innée, produit en particulier par les cellules épithéliales intestinales. Il avait été montré que le NO réprime l'expression du LEE et active celle de *gadE* et de *gadX*. Notre étude a permis d'identifier le régulateur clé responsable de ces régulations, NsrR. NsrR réprime indirectement l'expression de *gadE* et *gadX* et active l'expression des opérons LEE1, LEE4 et LEE5 en se fixant sur leurs promoteurs respectifs. En présence de NO, NsrR devient inactif. Ainsi, le NO réprime directement l'expression du LEE en supprimant la fixation de NsrR aux promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5, et indirectement en activant l'expression de *gadE* et donc de *gadX*. Un modèle de régulation intégrant l'ensemble de ces résultats est proposé.

D'autre part, nous avons identifié et caractérisé une nouvelle phosphodiesterase spécifique des EHEC les plus pathogènes, VmpA. Par son activité d'hydrolyse du di-GMPc, VmpA contrôle la mobilité bactérienne, la formation de biofilm, et probablement l'expression du LEE, mais aurait aussi un rôle plus général dans la physiologie des EHEC.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a foodborne pathogen causing hemorrhagic colitis and Hemolytic and Uremic Syndrome (HUS). After reaching the gut, EHEC adheres to the epithelial intestinal cells causing attachment/effacement lesions (A/E lesions). The *locus* of enterocyte effacement (LEE) encodes for a type three secretion system and several effector proteins required for A/E lesions. The LEE is composed of five main operons (LEE1-5). In this work we identified the molecular mechanisms of one of the regulatory cascades controlling LEE expression. Using qRT-PCR and chromatin immunoprecipitation we determined that GadE and GadX are two indirect repressors of LEE expression. GadE activates *gadX* expression, and GadX represses *ler* expression, the latter encoding the main activator of LEE2-5 operons. Moreover, GadE also represses LEE4 and LEE5 expression independently of Ler. In turn, Ler represses *gadE* and *gadX* expression.

Nitric oxide (NO) is a crucial effector of the innate immune response, in part produced by intestinal epithelial cells. It has been shown previously that NO represses LEE and activates *gadE* and *gadX* expression. In this study we identified the key regulator responsible for these regulations: NsrR. NsrR represses indirectly *gadE* and *gadX* expression and activates LEE1, LEE4 and LEE5 expression by binding to their respective promoter. In the presence of NO, NsrR is inactivated. Thus, NO directly represses LEE expression by relieving NsrR binding to the LEE1, LEE4 and LEE5 promoters, and indirectly by activating *gadE* and *gadX* expression. A regulatory model is proposed based on these results.

In addition, we identified and characterized a new phosphodiesterase which is specific for the most virulent EHEC strains: VmpA. By degrading c-di-GMPc, VmpA controls motility, biofilms formation, and probably LEE expression. It would also have a global effect on EHEC physiology.

Revue de littérature

1. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) :

1.1. Généralités sur les *E. coli* pathogènes intestinaux

Les *Escherichia coli* sont des bacilles à Gram négatif de la famille des entérobactéries. Ce sont des bactéries commensales de la flore intestinale des animaux à sang chaud comme les mammifères et les oiseaux. *E. coli* colonise le tractus intestinal dès les premières heures qui suivent la naissance et se maintient dans le côlon tout au long de la vie. Cette espèce bactérienne représente près de 80% de la flore aérobie facultative intestinale.

Cependant, certaines souches d'*E. coli* sont responsables d'infections humaines, et notamment d'infections intestinales. Ces souches ont été classées en différents pathovars en fonction des symptômes observés ainsi que des interactions qu'elles ont avec les cellules épithéliales (**Figure 1**) :

- 1) *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) : Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin et induisent des diarrhées aqueuses par la production d'entérotoxines thermo-labiles ou thermo-stables.
- 2) *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) : Les EIEC envahissent les cellules épithéliales du côlon, lysent la vacuole de phagocytose, se multiplient dans la cellule et se servent de microfilaments d'actine pour se mouvoir. Les EIEC peuvent probablement passer directement d'une cellule épithéliale à une autre.
- 3) *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC) : Les EAEC adhèrent aux cellules épithéliales du petit intestin et du côlon en formant un biofilm, ce qui conduit généralement à des diarrhées chroniques. Ils sécrètent des cytotoxines et des entérotoxines.
- 4) *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) : Lorsque les DAEC colonisent l'intestin, les entérocytes présentent une exacerbation de certaines microvillosités qui enveloppent les bactéries.
- 5) *E. coli* entéropathogènes (EPEC) : Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et détruisent la structure en brosse formée par les microvillosités à la surface des entérocytes, formant ainsi les lésions d'attachement et d'effacement (A/E). Les réarrangements du cytosquelette sont accompagnés d'une réponse inflammatoire et de diarrhées.

- 6) *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) : Les EHEC induisent également les lésions A/E, mais au niveau du côlon. Les EHEC produisent spécifiquement les Shiga-toxines (Stx), absorbées par la circulation systémique induisant des complications pouvant mettre en jeu le pronostic vital de l'individu infecté.

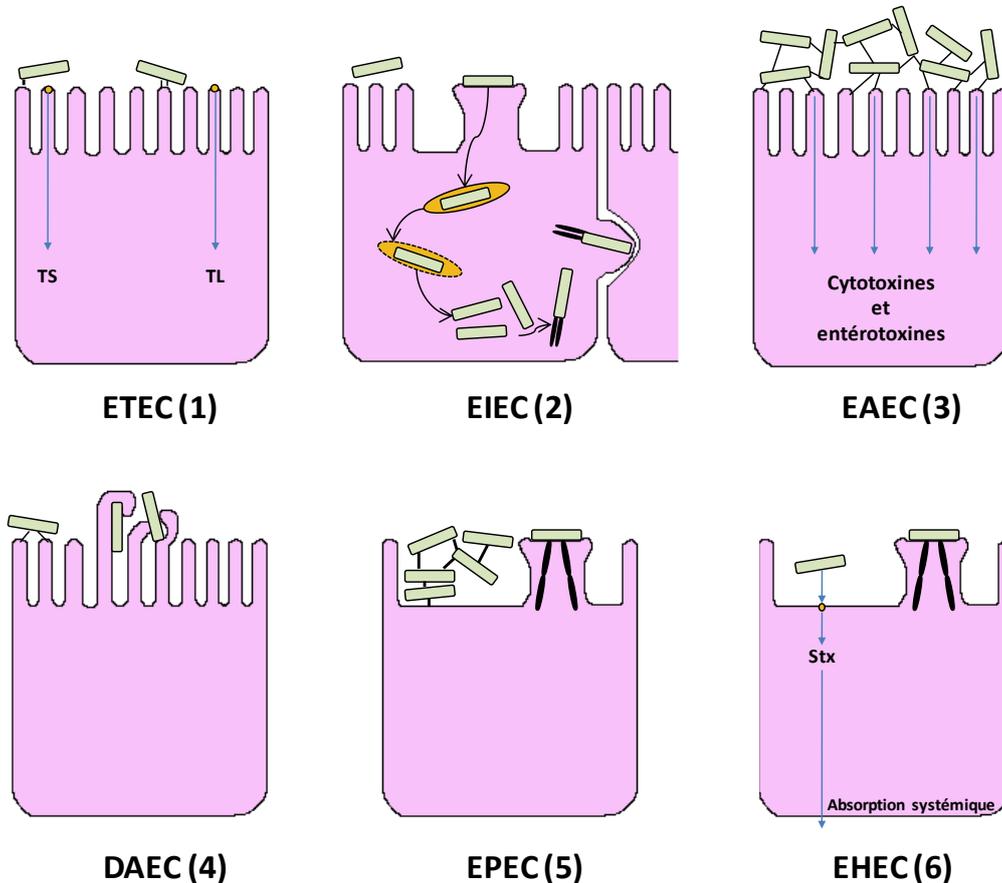


Figure 1: Modes de colonisation schématiques des différents pathovars d'*E. coli* intestinaux. D'après Kaper *et al.*, 2004 (Kaper *et al.*, 2004). Les pathovars d'*E. coli* sont définis par les caractéristiques d'interaction avec les cellules épithéliales de l'intestin, par leurs cellules cibles ainsi que par la production éventuelle de toxines spécifiques.

Les EHEC sont responsables de colites hémorragiques. Ces colites peuvent engendrer des complications, telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) dont l'issue peut être fatale. Ces symptômes sont essentiellement dus à la production d'une toxine par les EHEC : la Stx, qui classe les EHEC dans la famille des *E. coli* producteurs de Stx (STEC). Toutes les souches de STEC ne sont pas pathogènes pour l'Homme ; la dénomination EHEC est donc réservée aux STEC isolés en situation pathologique (Levine, 1987).

La nomenclature STEC est récente. Avant la découverte de la présence des Stx, le pathovar des STEC était appelé VTEC pour Verotoxigenic *E. coli*. Cette nomenclature a été donnée après une étude qui montrait que les Stx sécrétées par les STEC sont cytotoxiques sur des cellules Vero. Cet effet est différent de celui observé avec les entérotoxines des ETEC (Konowalchuk *et al.*, 1977).

1.2. Classification des STEC

1.1.1. Classification antigénique des STEC

Les STEC sont caractérisés par la combinaison sérotypique O:H:K des antigènes du lipopolysaccharide (LPS) (O), flagellaire (H) et capsulaire (K). Cependant, la combinaison O:H est la plus couramment utilisée pour décrire les STEC. Plus d'une centaine de sérotypes ont été identifiés chez les STEC isolés à partir d'échantillons humains (Johnson *et al.*, 2006). Le sérotype le plus fréquent et le plus virulent est O157:H7. Cependant, des souches provenant d'autres sérogroupes tels que O26 ; O145 ; O103 ; O111 ; O91 ; O55 ; O121 ont été isolés de cas cliniques (**Tableau 1**) (Rapport AFSSA <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>).

Sérogroupe	1996-2006	2007	2008
	%	%	%
O157	83	58	69
O26	6	7	7
O145	2	4	5
O103	3	5	2
O111	1	2	0
O91	1	0	1
O55	1	0	1
O121	0	5	1

Tableau 1 : Sérogroupes d'EHEC les plus fréquents, identifiés par sérologie ou par culture dans les cas de SHU pédiatriques en France, 1996-2006 (Rapport AFSSA <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>).

1.1.2. Les différents séropathotypes

Une classification des STEC en fonction du séropathotype est également utilisée (Karmali *et al.*, 2003). Les STEC sont alors classés en fonction de leur incidence et de leur association avec le SHU (**Tableau 2**). Le séropathotype A comprend les souches les plus virulentes et les plus fréquemment associées aux épidémies de SHU comme les souches de sérotype O157:H7, alors

que le sérotypage E comprend des souches qui n'ont jamais été associées à des pathologies chez l'Homme.

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

Tableau 2: Classification des STEC en fonction de la fréquence d'isolement lors d'épidémies ainsi que de la sévérité de la pathologie engendrée (Karmali *et al.*, 2003).

1.1.3. Classement phylogénétique

Phylogénie des E. coli

La classification phylogénétique des espèces a pour objectif de rendre compte des degrés de parenté entre les différentes espèces analysées. Cette classification s'effectue à partir des données génétiques et permet de comprendre leur histoire évolutive.

Une collection de 72 souches d'*E. coli* d'origines diverses a été réalisée (ECOR). L'analyse de la variabilité génétique de 11 enzymes ainsi que leurs profils électrophorétiques a permis de classer les différentes souches en 6 groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2, C, D et E (Ochman & Selander, 1984). Par la suite, une étude de la collection ECOR et de la collection DEC (comprenant 15 souches d'*E. coli* responsables de diarrhées) a montré une dispersion des *E. coli* parmi les différents groupes phylogénétiques (Boyd & Hartl, 1998). Les souches ExPEC (extra-intestinales) et UPEC (uropathogènes) appartiennent majoritairement aux groupes B2 et D. Les souches entéropathogènes sont quant à elles massivement présentes dans les groupes A et B1, et en particulier les souches des pathovars EHEC, ETEC et EIEC. Les souches des pathovars EPEC et EAEC ont des pathologies associées plus modérées que les 3 précédentes et sont présentes dans l'ensemble des groupes (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Les souches de

STEC/EHEC sont présentes majoritairement dans les groupes A et B1. Les souches d'EHEC de sérotype O157:H7 sont regroupées dans le groupe D (Girardeau *et al.*, 2005).

Origine et phylogénie des EHEC

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

Certaines études suggéraient que les EPEC dérivait de STEC ayant perdu les gènes codant les Stx. Cependant, il est plutôt admis aujourd'hui que les STEC seraient issus de 2 clones d'EPEC qui auraient acquis les gènes codant pour les Stx par transfert horizontal. Ce qui aurait conduit à l'émergence des 2 lignées majeures d'EHEC : EHEC-1 constituée de souches O157 et EHEC-2 constituées de souches O26 et O111 (Sperandio *et al.*, 1998 ; Wieler *et al.*, 1997).

1.3.Réservoirs et vecteurs

Le réservoir principal des STEC est le tube digestif des bovins. Il était admis que les STEC étaient présents principalement dans le rumen et le côlon. Une étude récente a cependant montré, par des méthodes de détection beaucoup plus sensibles que les précédentes, que les STEC sont présents tout le long du tube digestif des bovins (Keen *et al.*, 2010)(**Figure 2**). Les STEC seraient donc largement adaptés à tous les microhabitats du tractus gastro-intestinal des bovins. Cependant, des STEC, principalement de sérotype O157:H7, ont également été retrouvés chez d'autres espèces telles que le lapin, le cerf, le buffle, le cochon, le poulet ou encore les mouettes (Cornick & Vukhac, 2008; Dipineto *et al.*, 2006 ; Eriksson *et al.*, 2003 ; Foster *et al.*, 2006 ; Galiero *et al.*, 2005 ; Garcia-Sanchez *et al.*, 2007 ; Griffin & Tauxe, 1991 ; Pritchard *et al.*, 2001 ; Scaife *et al.*, 2006).

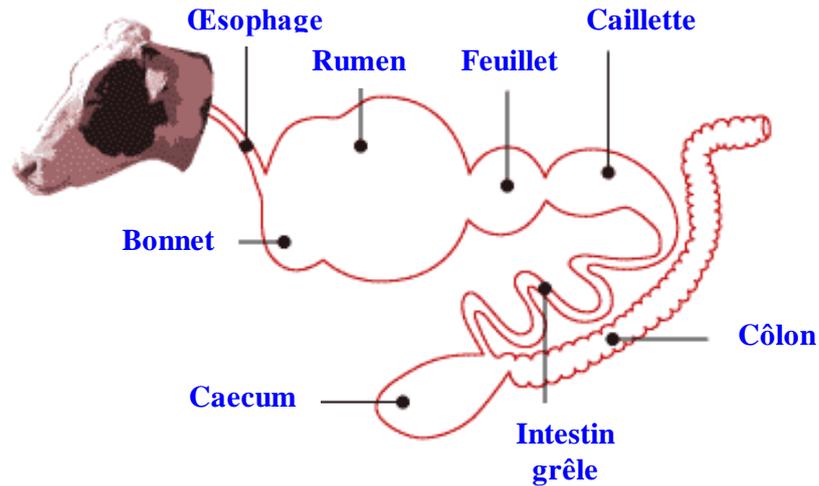


Figure 2: Structure du tube digestif du bovin. Les méthodes de détection plus sensibles ont permis de montrer que les STEC se retrouvent dans tous les compartiments du tractus gastro-intestinal, contrairement aux premières analyses qui laissaient suggérer un portage plus important au niveau du rumen et du côlon.

Il est important de souligner que le portage des STEC par les ruminants est asymptomatique, contrairement à l'Homme. Les taux de prévalence des STEC varient d'un pays à l'autre. L'analyse du portage des STEC par les bovins peut s'effectuer de différentes façons, comme par exemple la culture des STEC ou la détection de gènes *stx*, codant pour la Stx, dans les fèces des bovins. Une étude qui combinait les techniques de PCR et de culture a permis de montrer que sur 988 échantillons collectés en France (Régions Bourgogne et Rhône-Alpes), 207 sont positifs pour la présence de gènes *stx* dans les souches d'*E. coli*. Parmi ces échantillons, il y a 27 souches de STEC différentes qui peuvent représenter un danger pour la population (Vernozy-Rozand *et al.*, 2004). Les techniques de détection de STEC ne sont pas identiques d'un pays à l'autre, et on retrouve également de grandes différences de prévalence de STEC en fonction du pays. Par exemple, aux Etats-Unis, on retrouve 11.4% des bovins porteurs d'EHEC O157:H7 dans les fèces, au Brésil on retrouve 82% de bovins laitiers porteurs de STEC (tous sérotypes) dans les fèces, alors qu'en France seulement 7.9% des bovins sont porteurs de STEC (tous sérotypes) (Rapport de l'AFSSA : Bilan des connaissances relatives aux STEC). La prévalence du portage des STEC par les bovins varie également en fonction du mode d'élevage. En effet, la prévalence des STEC varie de 0.3 à 56% chez des animaux issus d'élevages intensifs, et de 1 à 45% chez les animaux issus d'élevages extensifs (Hussein, 2007). D'autres études ont montré que le portage suit un rythme saisonnier, avec une prévalence du portage qui augmente pendant les mois les plus chauds (Jenkins *et al.*, 2002).

Les STEC sont excrétés par les bovins et leur concentration dans les fèces varie d'un animal à l'autre. Une étude a montré que la concentration en STEC peut varier de 10^2 à 10^5 CFU/g de fèces (Zhao *et al.*, 1995). Dans les troupeaux, certains bovins excrètent beaucoup plus que d'autres : ce sont les super excréteurs. En effet, ces super excréteurs sont porteurs de STEC à raison de plus de 10^3 CFU/g de fèces et sont responsables de la diffusion des STEC au sein d'une ferme (Cobbold *et al.*, 2007). De plus, l'âge de l'animal ainsi que son sexe semblent être des facteurs importants pour le portage des STEC ainsi que pour leur excrétion. En effet, les jeunes animaux avant sevrage sont rarement porteurs de STEC. En revanche, chez les animaux jeunes après le sevrage, la prévalence du portage des STEC est plus importante que chez les animaux âgés (Cray & Moon, 1995 ; Garber *et al.*, 1995 ; Hancock *et al.*, 1997 ; Wells *et al.*, 1991 ; Zhao *et al.*, 1995). De plus, l'excrétion de STEC est plus importante chez les génisses que chez les veaux (Hancock *et al.*, 1997 ; Shere *et al.*, 1998). Des études ont montré que des pH plus faibles et des concentrations plus élevées en acides gras à chaîne courte résultent en un portage de STEC moins important. Les aliments utilisés dans les exploitations influent sur le pH ruminal ainsi que sur la concentration des acides gras à chaîne courte en fonction des nutriments utilisés. Notamment, la prévalence des STEC chez les bovins nourris par les fourrages est généralement plus importante. Cette prévalence plus importante est expliquée par des concentrations plus élevées en tannins ainsi qu'en acide phénolique, qui jouent sur le pH ruminal ainsi que par la concentration des acides gras à chaîne courte (Brown *et al.*, 1997 ; Hancock *et al.*, 1997 ; Harmon *et al.*, 1999). 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 (Ogden *et al.*, 2004 ; Omisakin *et al.*, 2003).

Les STEC entrent dans la chaîne alimentaire de différentes façons (**Figure 3**).

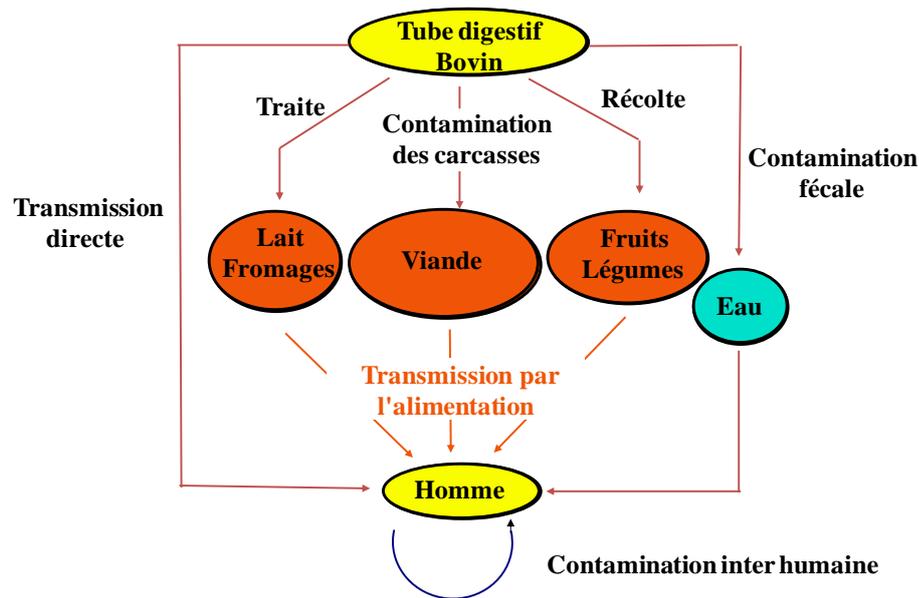


Figure 3 : Modes de contamination aux STEC des différents produits de la chaîne alimentaire.

Tout d’abord, la viande contaminée est la première cause d’infections à EHEC. Si la découpe a lieu correctement, il est peu probable que la viande se retrouve en contact avec le tube digestif porteur d’EHEC. En revanche, si les règles d’hygiène ne sont pas respectées, la contamination de la viande peut avoir lieu par contact direct avec le tube digestif ou des cuirs des bovins, également porteurs d’EHEC.

Les laits et fromages au lait cru sont également incriminés lors d’infections à EHEC. Les cuirs des bovins peuvent être porteurs d’EHEC, qui se retrouvent alors dans le circuit du lait lors de la traite. Les règles d’hygiène préconisent de nettoyer les pis des vaches avant la traite afin d’éliminer toute source de contamination.

L’excrétion des EHEC dans l’environnement peut conduire à la contamination de l’eau de boisson ou de baignade en aval. L’excrétion bovine est également à l’origine de la contamination des fruits et des légumes lors de l’épandage de fumier contaminé.

La contamination de l’Homme peut également se faire directement par le bovin à la ferme, si les règles d’hygiène après la visite des animaux ne sont pas respectées.

Enfin, des contaminations inter-humaines ont été rapportées lors d’épidémies, en particulier dans les hôpitaux et dans les crèches.

1.4. Aspects cliniques- Symptômes- Traitements

1.4.1. Symptomatologie

La dose infectieuse des EHEC est de moins de 50 bactéries (Rapport de l'AFSSA). Cette dose infectieuse est très faible pour un pathogène ingéré, si l'on compare à d'autres pathogènes tels que *Salmonella* Typhimurium pour lequel la dose infectieuse est de 10^5 à 10^6 bactéries ingérées (Hornick *et al.*, 1970). Cette faible dose infectieuse des EHEC est très probablement due aux mécanismes de résistance à l'acidité très performants des EHEC qui leur permettent de résister efficacement à l'acidité gastrique. Les symptômes de l'infection apparaissent séquentiellement dans les 15 jours suivant l'ingestion de l'aliment contaminé (**Figure 4**). Les premiers symptômes apparaissent sous forme de diarrhées aqueuses modérées entre 1 et 9 jours après l'ingestion (Brunton *et al.*, 1994). Dans 90% des cas, les diarrhées deviennent sanglantes et s'accompagnent de sévères douleurs abdominales spasmodiques ainsi que d'une déshydratation modérée. Cette colite hémorragique persiste entre 2 et 10 jours, peut s'accompagner de vomissements mais n'induit généralement pas d'apparition de fièvre. Des complications apparaissent dans 10% des cas une semaine environ après le début des symptômes. Ces complications peuvent mettre en jeu le pronostic vital de l'individu. Elles sont dues à la production de Stx dans l'intestin et se traduisent par des microangiopathies thrombotiques de deux types : le SHU et le PTT (**Figure 4**) (Gillis, 1996 ; Nivet *et al.*, 1995).

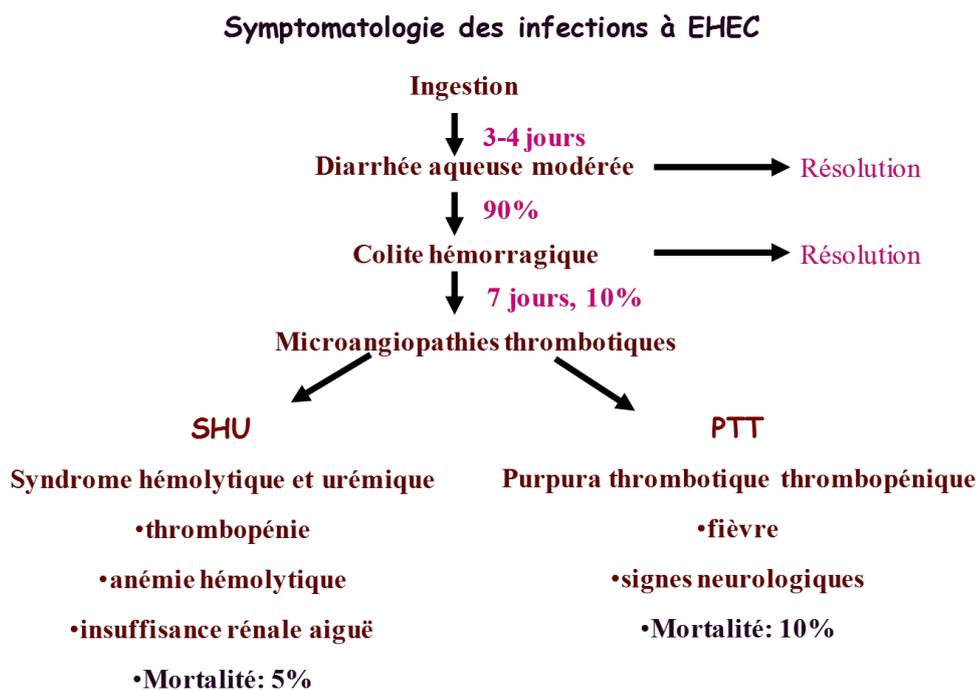


Figure 4: Evolution clinique après l'ingestion des EHEC.

Le SHU se caractérise par une anémie microangiopathique hémolytique, une thrombopénie ainsi qu'une insuffisance rénale aiguë. Il a également été observé des troubles du système nerveux central tels que léthargie, convulsions, et encéphalopathie (Tesh *et al.*, 1993). Le SHU touche essentiellement les enfants de moins de 5 ans et est la première cause d'insuffisance rénale aiguë en France (<http://www.anses.fr/>).

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

1.4.2. Diagnostic

Le diagnostic des infections à EHEC repose sur l'isolement et l'identification des EHEC dans les selles, sur la mise en évidence de la présence de Stx libres ou des gènes *stx1* et *stx2* (par PCR) et/ou sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques dirigés contre le LPS et la flagelline.

1.4.3. Traitements

A ce jour, il n'existe aucun traitement contre les infections à EHEC. Les traitements sont donc essentiellement symptomatiques : diurèse, hémodialyse, transfert de plasma frais... (Andreoli *et al.*, 2002). Ces traitements permettent de diminuer la morbidité de 40 à 4% pour les patients atteints du SHU et de 90 à 10% pour les patients atteints de PTT (Gillis, 1996). Cependant, il est important de noter que les séquelles sont fréquentes et durables, notamment au niveau rénal. Le taux de guérison des séquelles est d'environ 70%.

La plupart des infections bactériennes sont soignées par l'antibiothérapie. En ce qui concerne les infections à EHEC, celle-ci est très discutée. Plusieurs études ont montré que l'antibiothérapie est inefficace sur les infections à EHEC, elle serait même un facteur de risque pour l'apparition du SHU. En effet, les gènes codant les Stx sont portés par des phages de type λ en phase lysogénique. Certains antibiotiques induisent des cassures de l'ADN bactérien, induisant le cycle lytique du phage, et favorisant l'expression et la synthèse de Stx. Certains antibiotiques bactériostatiques sont à l'étude comme l'Imipenem, qui diminue la cytotoxicité des EHEC de sérotypes O26, O111 et O157 sur les cellules Vero. L'Imipenem diminue également la quantité de Stx libérées par les EHEC (Lee & Stein, 2009). La fosfomycine est également étudiée dans la lutte contre les infections à EHEC aux stades précoces puisqu'elle diminue l'expression des gènes codant pour la Stx (Ichinohe *et al.*, 2009).

Plusieurs nouvelles thérapies sont également à l'étude, comme par exemple l'administration d'anticorps anti-Stx qui ont été testés chez la souris et le porcelet gnotobiotique. Chez la souris, l'administration d'anticorps anti-Stx diminue la mortalité lors d'une infection expérimentale par les EHEC (Yamagami *et al.*, 2001), et chez le porcelet gnotobiotique, diminue la probabilité d'apparition de symptômes neurologiques et également la mortalité (Sheoran *et al.*, 2005). De plus, des bactéries recombinantes qui produisent des analogues structuraux du récepteur de la toxine ont été administrées à un modèle murin. L'administration de ces bactéries supprime toute létalité due à O157:H7 (Paton *et al.*, 2000). Enfin, l'administration par voie orale de composés peptidiques (Nishikawa *et al.*, 2006) ou glucidiques (Takeda, 1998) qui miment le récepteur de la toxine permettrait de séquestrer la toxine dans la lumière intestinale.

Enfin, parmi les nouvelles thérapies, on peut citer celle qui a été testée récemment, lors de l'épidémie de 2011 en Allemagne. La Stx peut activer le complément, et cette activation est liée à l'apparition des symptômes les plus graves de l'infection à EHEC. Lors de la récente épidémie allemande, des chercheurs ont administré à des patients atteints du SHU un anticorps anti-complément (Eculizumab) qui inhibe l'activation du complément. Les trois patients traités avec cette molécule ont été guéris très rapidement des lésions cérébrales et rénales qu'ils avaient (Lapeyraque *et al.*, 2011). Cette thérapie est encourageante pour la suite, mais l'administration d'anticorps est très coûteuse.

De nombreuses études sont encore nécessaires afin de proposer des stratégies alternatives efficaces et peu coûteuses pour lutter contre les infections à EHEC.

1.5. EHEC- épidémies

1.5.1. Dans le monde

Première épidémie à EHEC :

Les EHEC ont été décrits pour la première fois en 1982, lors de deux épidémies qui ont touché 2 états du continent nord-américain : l'Oregon et le Michigan. L'aliment incriminé était de la viande hachée peu cuite retrouvée principalement dans les hamburgers. Les souches responsables des épidémies étaient de sérotype O157:H7. 47 personnes ont été infectées dont 35 ont été hospitalisées. La souche de référence EDL933 a été isolée d'un hamburger lors de l'une de ces épidémies.

Epidémies mondiales de grande ampleur :

Par la suite, des épidémies de grande ampleur ont touché des pays développés dans le monde entier. De la viande hachée peu cuite contaminée a été incriminée dans diverses épidémies. On peut citer par exemple celle de 1993 aux USA où la viande hachée était contaminée par une souche de sérotype O157:H7. 501 personnes ont été infectées, 45 ont présenté un SHU et 3 sont décédées. Des épidémies ont également été rapportées suite à l'ingestion de fruits ou légumes contaminés. Par exemple, une des plus grandes épidémies à EHEC a eu lieu au Japon en 1996. Des pousses de radis crues servies en collectivité étaient contaminées par une souche de sérotype O157:H7 et ont infecté 9 451 personnes, dont 101 présentaient un SHU et 12 sont décédées. La souche de référence Sakai a été isolée lors de cette épidémie. Le lait cru et le fromage au lait cru ont déjà été incriminés lors d'épidémies à EHEC. Par exemple, en 2010, les Etats-Unis ont été touchés par une épidémie suite à l'ingestion par plusieurs personnes de fromage au lait cru contaminé par une souche de sérotype O157:H7. Cette épidémie a touché 38 personnes, dont une a développé un SHU. Enfin, l'eau de baignade ou de boisson a également été incriminée lors d'épidémies. C'est le cas par exemple de l'épidémie qui a touché le Canada en 2000. L'eau de boisson était contaminée par une souche de sérotype O157:H7. Plus de 2 000 personnes ont été touchées, 27 ont développé un SHU et 7 sont décédées.

En 2011, l'épidémie en Allemagne a été l'épidémie européenne à EHEC la plus importante. Elle a touché plus de 4 000 personnes. 850 ont été victimes de SHU et 51 sont décédées. L'aliment incriminé était des graines de fenugrec en provenance d'Egypte (Rapport EFSA, 2011). La souche responsable de l'épidémie est de sérotype O104:H4. On peut classer cette souche dans le pathovar des *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) (Rasko *et al.*, 2011; Scheutz *et al.*, 2011). Son génome est identique à 93% à celui de la souche d'*E. coli* entéroaggrégative O104:H4 (souche 55989) isolée en Afrique à partir d'un patient atteint du HIV qui présentait des diarrhées chroniques. La souche O104:H4 responsable de l'épidémie allemande présente un profil de multi-résistance aux antibiotiques (résistance aux molécules suivantes : ampicilline, céfotaxime, ceftazidime, streptomycine, sulfaméthoxazole, triméthoprime, cotrimoxazole, tétracycline et acide nalidixique) (Rasko *et al.*, 2011). Elle possède également un gène codant pour une pénicillinase (Avis de l'ANSES Saisine n°2011-SA-0158). La souche O104:H4 ne possède pas la plupart des gènes de virulence des EHEC, comme ceux responsables de l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales. Cependant, elle possède les gènes codant les facteurs d'adhésion des EAEC, qui fonctionnent différemment de ceux des EHEC et qui sont

responsables notamment de la persistance des EAEC dans l'intestin. De plus, la souche O104:H4 possède le gène *stx2* (Rasko *et al.*, 2011), qu'elle aurait acquis par transfert horizontal avec une souche de STEC. La combinaison de la persistance des EAEC avec la production de Stx est probablement la cause de l'incidence élevée de l'apparition du SHU lors de cette épidémie, puisque les patients auraient été exposés plus longtemps à la Stx. Peu d'enfants ont été atteints par la souche O104:H4, probablement parce que les graines germées sont majoritairement consommées par des femmes et non des enfants. Du point de vue symptomatique, la souche O104:H4 est une STEC puisqu'elle produit des Stx, et elle a été impliquée dans des symptômes de colites hémorragiques, on peut donc la classer dans le pathovar des EHEC. Les EAEC n'ont jamais été retrouvés chez les bovins. Le réservoir connu des EAEC est principalement l'Homme. L'origine de la contamination serait donc humaine, chez un individu qui aurait eu une souche d'EHEC et une souche d'EAEC. La cohabitation des deux bactéries aurait donné lieu à un transfert horizontal à la suite duquel la souche d'EAEC aurait acquis les gènes codant pour la Stx. C'est l'excrétion d'origine humaine suivie d'une mauvaise hygiène personnelle qui aurait donné lieu à la contamination des graines de fenugrec à germer.

1.5.2. En France :

En 2005 :

En 2005, deux épidémies à EHEC ont touché la France.

La première épidémie a touché le sud-ouest de la France et était due à la consommation de steaks hachés de bœuf surgelés contaminés par des EHEC O157:H7. Elle a touché 69 personnes et a provoqué 17 cas de SHU majoritairement chez des jeunes enfants.

La seconde épidémie a touché principalement la Normandie. Elle était due à la contamination de camembert au lait cru par une souche d'EHEC O26:H11. 17 personnes ont contracté un SHU. Elle a également touché principalement les jeunes enfants.

En 2011 :

En 2011, il y a eu deux épidémies à EHEC en France.

La première épidémie était due à la consommation de steaks hachés de la marque « Steak Country » distribuée par l'enseigne Lidl à Lille. La souche responsable de l'épidémie était une souche d'EHEC O157 et a provoqué 10 cas de SHU, essentiellement chez de jeunes enfants.

La deuxième épidémie était liée à l'épidémie qui a eu lieu en Allemagne à la même période puisque la souche incriminée était la souche O104:H4, similaire à celle responsable de l'épidémie en Allemagne, et l'aliment mis en cause était des graines germées de fenugrec, des germes de moutarde et de roquette, provenant du même fournisseur égyptien que les graines germées responsables de la contamination en Allemagne. Cette épidémie a touché 15 personnes et a provoqué 8 cas de SHU.

2. Physiopathologie

2.1. La résistance à l'acidité gastrique

Après ingestion par le consommateur, les pathogènes intestinaux se retrouvent dans l'estomac, où ils doivent faire face au premier système de défense de l'hôte : l'acidité gastrique. Les bactéries ont élaboré des stratégies pour faire face à cette première barrière en développant différents mécanismes de résistance à l'acidité. Parmi eux, 3 mécanismes sont basés sur la décarboxylation d'acides aminés, comme par exemple le système glutamate dépendant (GAD), basé sur la décarboxylation du glutamate. Seul le système GAD sera décrit ici.

Le système GAD permet aux EHEC de résister à des pH très faibles, avoisinant 2, dans un milieu contenant du glutamate. Il est composé de deux glutamate décarboxylases : GadA et GadB (Smith *et al.*, 1992), et d'un antiporteur : GadC (Hersh *et al.*, 1996). GadC permet l'entrée dans la bactérie du glutamate, qui est décarboxylé par GadA et GadB en γ -aminobutyrate (GABA). Cette réaction de décarboxylation consomme un proton et permet d'augmenter le pH intracellulaire. Le GABA est ensuite externalisé par l'antiporteur GadC (**Figure 5**). Une seule des deux décarboxylases est nécessaire pour la survie des *E. coli* à pH 2.5, alors que la présence des deux est nécessaire à la survie à pH 2 (Castanie-Cornet *et al.*, 1999).

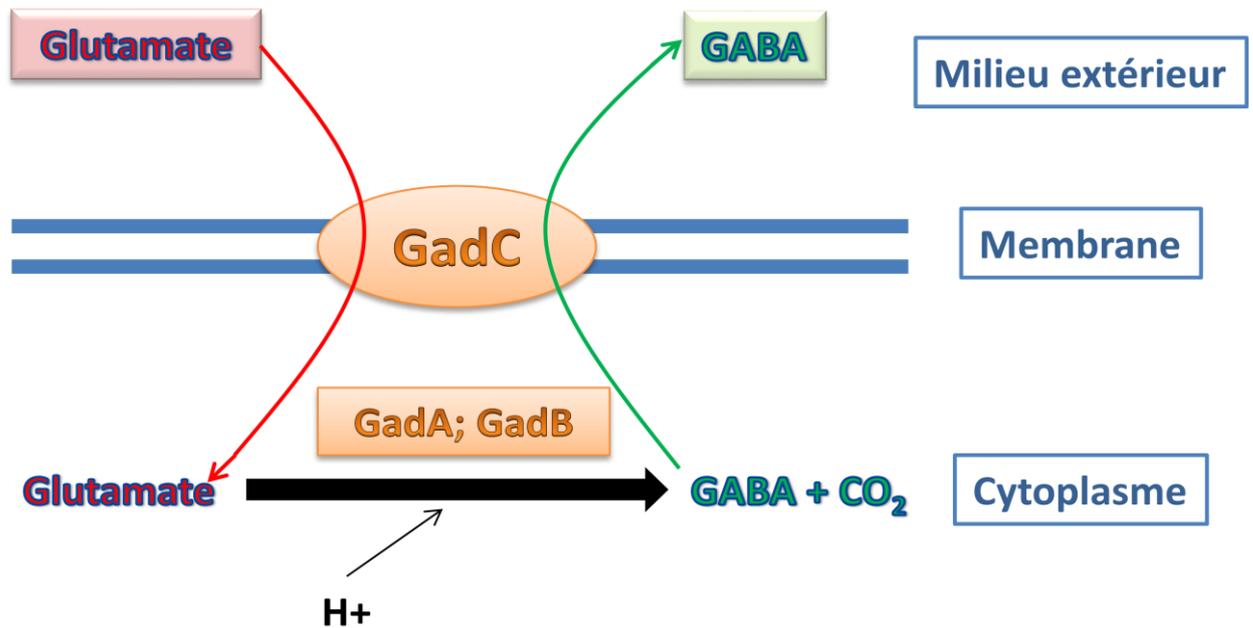
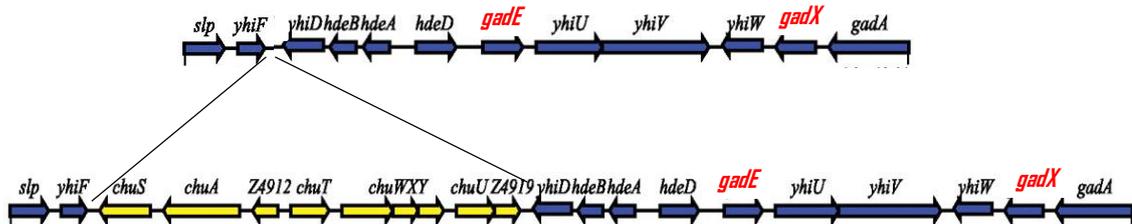


Figure 5 : Système de résistance à l'acidité dépendant du glutamate. GadC est l'antiporteur qui permet l'entrée dans la cellule du glutamate et la sortie de γ aminobutyrate (GABA). Les décarboxylases GadA et GadB permettent la décarboxylation du glutamate en GABA en consommant un proton.

L'Acid Fitness Island (AFI) est un îlot génomique spécifique des *E. coli* codant pour des protéines impliquées dans la résistance à l'acidité (**Figure 6**).

E. coli K12 souche MG1655



E. coli O157:H7 souche EDL933

Figure 6 : Acid Fitness Island de la souche *E. coli* K-12 MG1655 (Mates *et al.*, 2007) et de la souche EHEC O157:H7 EDL933. L'acid fitness island des EHEC O157:H7 possède une région génomique supplémentaire (en jaune) entre *yhiF* et *yhiD* codant pour des gènes impliqués dans le métabolisme du fer.

Parmi ces dernières, HdeA et HdeB sont des protéines chaperons de l'espace périplasmique qui fixent les protéines à pH acide afin d'empêcher leur agrégation. On retrouve également le régulateur transcriptionnel YhiF de la famille LuxR. YhiF joue un rôle dans la résistance à l'acidité notamment en présence de lactate, succinate et formate, cependant son régulon et son

mode d'action n'ont pas encore été définis. La protéine Slp est également codée par l'AFI. Slp est une protéine de la membrane externe et limiterait la pénétration de certains acides organiques à travers la membrane. Elle pourrait également jouer un rôle de transducteur de signal en conditions acides. Il existe également un système de résistance à l'acidité activé par une forte densité bactérienne. Il met en jeu au moins 2 protéines codées par l'AFI : YhiD et HdeD qui sont des protéines membranaires (Mates *et al.*, 2007).

La régulation du système GAD chez *E. coli* K-12 est très complexe et fait intervenir de nombreuses molécules dont l'activité dépend des conditions environnementales.

La synthèse des protéines impliquées dans le système GAD est régulée par de petits ARN non codants, dont les principaux sont DsrA et GadY (Lease *et al.*, 2004 ; Opdyke *et al.*, 2004). La régulation par DsrA est indirecte. En effet, DsrA se fixe aux ARNm de RpoS et H-NS, favorisant la traduction de RpoS et la dégradation de l'ARNm de H-NS (Lease *et al.*, 2004). RpoS active l'expression des gènes de l'AFI (Weber *et al.*, 2005) alors que H-NS la réprime (Hommais *et al.*, 2001). GadY, quant à lui, est codé par *gadY*, situé en aval de *gadX*. Lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance, la transcription de *gadY* est activée par RpoS. Hfq se fixe alors sur l'ARN non codant GadY afin d'empêcher sa dégradation (Ma *et al.*, 2002 ; Opdyke *et al.*, 2004 ; Tucker *et al.*, 2003). GadY se fixe sur l'ARNm de *gadX* pour le stabiliser et favoriser sa traduction (Opdyke *et al.*, 2004). De plus, l'expression de *gadX* est activée par GadW, qui présente une forte homologie avec GadX. Toutes deux appartiennent à la famille des protéines régulatrices AraC. Comme toutes les protéines de cette famille, GadX et GadW possèdent un domaine N-terminal impliqué dans la dimérisation. GadX et GadW forment ainsi des homodimères. Elles possèdent aussi un domaine de fixation à l'ADN, et GadX se fixe à l'ADN sur des séquences appelées « gad box » : 5'-WANDNCTDWTWKTRAYATWAWMATGKCTGATNTTWTWYNTYAK-3' (Tramonti *et al.*, 2008). A pH acide, GadX active l'expression de nombreux gènes comme *gadA*, *gadBC*, *gadE*, *yhiF* et *hdeAB*, alors qu'elle n'a aucun effet à pH neutre (Tucker *et al.*, 2003). GadW, en plus de son rôle dans l'activation de l'expression de *gadX*, réprime l'expression de *gadA* et *gadBC*, et ce de façon GadX-dépendante (Ma *et al.*, 2002 ; Tucker *et al.*, 2003). Cette répression GadX-dépendante se produit probablement par une interaction entre GadX et GadW, qui empêche GadX de se fixer sur les promoteurs de ses cibles. En absence de GadX, GadW est capable d'activer l'expression des gènes qu'il réprimait en présence de GadX.

Parmi les gènes cibles de GadX, on retrouve le régulateur principal de l'AFI : GadE (appelé auparavant YhiE), codé par l'AFI. En plus de son activation par GadX, l'expression de *gadE* est activée par la voie EvgA/YdeO. EvgA/YdeO est un système à deux composants dans lequel chacun des composants peut se fixer indépendamment l'un de l'autre au promoteur de *gadE* et en activer l'expression (Ma *et al.*, 2004). Les EHEC O157:H7 sont plus résistants à l'acidité que les autres souches d'*E. coli*, et ils possèdent des régulateurs spécifiques de la résistance à l'acidité non codés par les autres souches d'*E. coli*. Ces régulateurs sont codés par des gènes portés par des prophages. Chez la souche EDL933, les îlots OI-50 et OI-57 hébergent des prophages contenant les gènes *psrA* et *psrB*, respectivement. Ces gènes codent pour des protéines régulatrices de la famille AraC, capables de se fixer *in vitro* sur la région promotrice de *gadE*, ce qui suggère qu'elles activent directement l'expression de ce dernier (Tree *et al.*, 2011). Des analyses *in silico* montrent que des homologues de *psrA* et *psrB* sont retrouvés uniquement chez d'autres souches d'EHEC ainsi que chez certaines souches d'autres pathovars d'*E. coli* (**Tableau 3**), mais pas chez des *E. coli* commensales. Ces deux gènes semblent donc être liés à la pathogénicité.

Souche	Pathovar	Pourcentage de similarité avec <i>psrA</i>	Pourcentage de similarité avec <i>psrB</i>
<i>E. coli</i> O157:H7 str. Tw14359	EHEC	100%	99%
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	EHEC	100%	99%
<i>E. coli</i> O157:H7 str. Sakai	EHEC	100%	99%
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	EHEC	99%	99%
<i>E. coli</i> O26 :H11 str. 11368	EHEC	99%	99%
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	EHEC	99%	99%
<i>E. coli</i> O55 :H7 str. CB9615	EPEC	99%	94%
<i>E. coli</i> O55:H7 str. RM12579	EPEC	99%	94%
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	EHEC	96%	99%
<i>E. coli</i> S88	<i>E. coli</i> extra-intestinal	93%	98%
<i>E. coli</i> UMNK88	EPEC (souche porcine)	93%	92%

Tableau 3 : Les différentes souches qui possèdent des gènes homologues aux gènes *psrA* et *psrB* de la souche d'EHEC O157:H7 EDL933 ainsi que les pourcentages de similarité. Le BLAST a été effectué sur les séquences génomiques de 51 souches d'*Escherichia coli* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Récemment, une autre protéine de la famille Ara-C, PatE (*z0321*), a été décrite comme un activateur de l'expression des gènes impliqués dans la résistance à l'acidité (Bender *et al.*, 2012). Le gène codant PatE est fortement exprimé chez les EHEC en phase stationnaire, et son expression est probablement activée par RpoS (Dong & Schellhorn, 2009). Parmi les gènes

activés par PatE, on retrouve *gadE*, *hdeA*, *hdeB*, *gadA*, *gadB* et *slp*. Les mécanismes de régulation précis n'ont pas été déterminés, mais sont probablement GadE-dépendants, c'est-à-dire que PatE activerait l'expression de *gadE*, GadE, à son tour activant l'expression des gènes cibles.

GadE est un régulateur de la famille LuxR. Il régule l'expression des gènes cibles en se fixant, tout comme GadX, sur des séquences consensus appelées également « gad box », qui diffèrent des « gad box » décrites pour GadX : 5'-TTAGGATTTTGTATTAAA-3' (Ma *et al.*, 2004). Un mutant *gadE* est hautement sensible à un pH acide (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). En milieu acide, GadE active l'expression entre autre de *gadA*, *gadX* et *hdeAD*, mais il est également capable d'activer sa propre expression (Hommais *et al.*, 2004). L'activation de l'expression de *gadA* se fait par la fixation de l'hétérodimère RcsB-GadE sur la « gad box » en amont de *gadA* (Castanie-Cornet *et al.*, 2010). RcsB est une protéine qui fait partie d'un système à plusieurs composants (RcsABCD), où RcsC et RcsD sont les récepteur membranaires et RcsA et RcsB sont les protéines régulatrices qui répondent à ce signal (Majdalani & Gottesman, 2005). RcsB est également requis pour l'expression de gènes non régulés par GadE, comme par exemple, *gadW* et *gadY* (Johnson *et al.*, 2011).

2.2.L'adhésion à l'épithélium intestinal et les perturbations du cytosquelette

L'adhésion des EHEC de sérotype O157:H7 à l'épithélium colique se caractérise par des lésions A/E. Les gènes responsables des lésions A/E sont codés par un îlot de pathogénicité, le *locus* d'effacement des entérocytes (LEE) (McDaniel *et al.*, 1995). Certaines souches O157:H7 possèdent également divers facteurs d'adhésion non reliés aux lésions A/E. Cependant, ils ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans l'adhésion, car la seule délétion du LEE conduit à l'absence de colonisation chez le modèle lapin (Ritchie & Waldor, 2005) et chez le bovin (Dziva *et al.*, 2004). Nous ne parlerons donc ici que des lésions A/E.

2.2.1. Les lésions d'attachement et d'effacement des entérocytes

Ces lésions A/E sont caractérisées par l'adhésion intime des bactéries à la surface des entérocytes, par l'effacement des microvillosités qui forment la structure en brosse et par la réorganisation du cytosquelette de la cellule épithéliale intestinale. Le réarrangement du cytosquelette induit la formation d'un piédestal sous la bactérie (**Figure 7**) (Campellone & Leong, 2003; Frankel *et al.*, 1995 ; Kaper, 1998 ; Sherman & Soni, 1988).

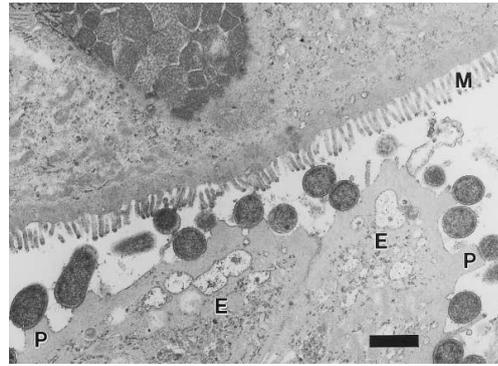


Figure 7 : Lésions d'attachement et d'effacement induites par une souche d'EHEC O157:H7 sur des cellules épithéliales rectales de mouton. Les bactéries adhèrent à la surface des entérocytes (E). Les microvillosités (M) sont effacées et on observe l'apparition de piédestal (P) sous certaines bactéries (Wales *et al.*, 2001).

Chez les EHEC O157:H7, les gènes codant pour les protéines nécessaires à la formation des lésions A/E sont principalement situés sur le LEE (43,36 kb) composé de 54 ORF's, situé sur le chromosome bactérien. Le LEE est composé de cinq opérons majeurs : LEE1 à LEE5 (**Figure 8**).

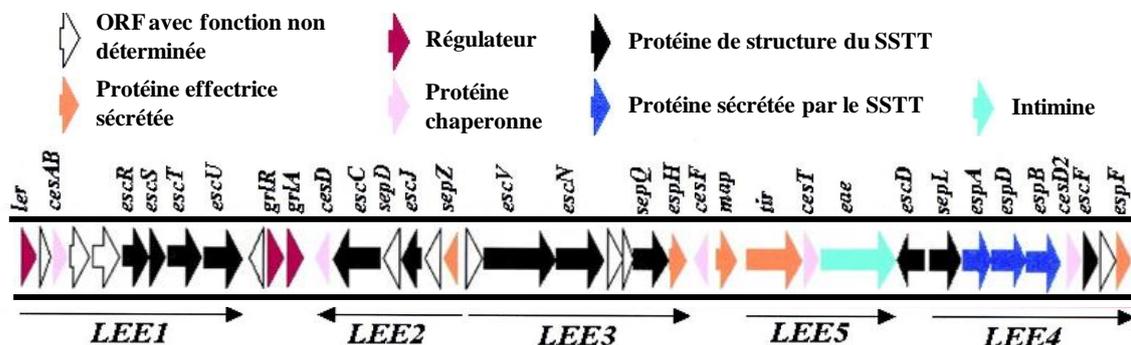


Figure 8 : Locus d'effacement des entérocytes (LEE) des EHEC (D'après (Garmendia *et al.*, 2005)).

Le réarrangement du cytosquelette des entérocytes par les EHEC ainsi que l'attachement intime sont consécutifs à l'injection dans les entérocytes de molécules effectrices bactériennes sécrétées par un Système de sécrétion de type III (SSTT). Ce dernier est composé notamment d'une seringue et d'un translocon qui permettent le passage direct des protéines effectrices de la bactérie à la cellule hôte.

- Le Système de Sécrétion de Type Trois

Le SSTT est un système de sécrétion utilisé par de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif pour injecter des protéines effectrices directement dans le cytosol de la cellule hôte (Hueck, 1998). Le SSTT possède une structure très conservée d'une espèce à l'autre. Chez les

EHEC, il est constitué de protéines codées principalement par les LEE1, LEE2 et LEE3 (**Figure 9**). Il est constitué d'un anneau basal inséré dans la membrane interne bactérienne. Cet anneau est formé par les protéines EscD, EscQ, EscR, EscS, EscT, EscU et EscV (Gauthier *et al.*, 2003 ; Kresse *et al.*, 1998 ; Ogino *et al.*, 2006), avec à sa base les protéines SepD et SepL. L'ATPase (EscN) est associée à la base dans le cytoplasme et permet de fournir l'énergie nécessaire pour le transfert des autres protéines de structure du SSTT et pour la sécrétion des protéines effectrices (Crepin *et al.*, 2005). EscC est exporté de façon Sec-dépendante et se multimérise pour former un pore dans la membrane externe (Crepin *et al.*, 2005). EscJ est la protéine périplasmique qui 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 ; Knutton *et al.*, 1998 ; Yip *et al.*, 2005). EscF est ancrée sur EscC et forme la seringue sur laquelle le translocon peut être assemblé. Le translocon est constitué par la polymérisation des protéines EspA qui forment un large filament creux reliant la bactérie à la cellule hôte (Delahay *et al.*, 1999), chapeauté par EspB et EspD formant un pore dans la membrane de la cellule hôte. (Knutton *et al.*, 1998)

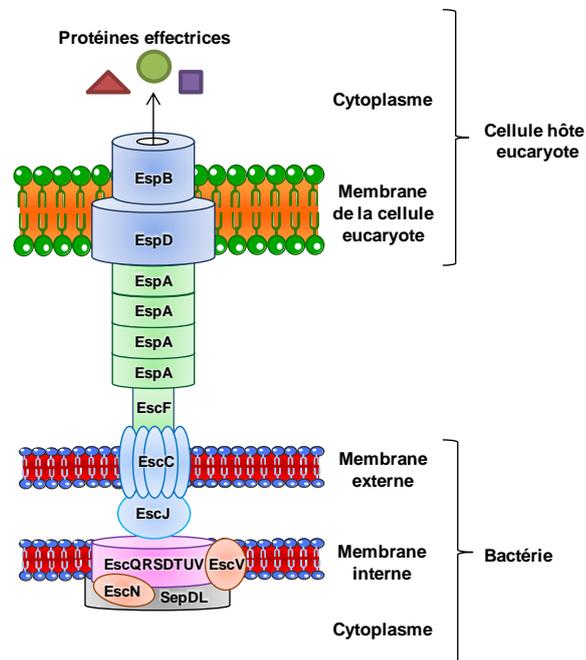


Figure 9 : Structure du système de sécrétion de type III chez les EHEC. D'après (Tree *et al.*, 2009).

- L'attachement intime

Le SSTT permet l'injection des protéines effectrices dans la cellule hôte. Parmi les protéines effectrices, Tir est une protéine de 78 kDa codée par le LEE5 et s'ancre dans la membrane de la

cellule hôte. L'interaction entre l'intimine Eae (*E. coli* attaching and effacing) ancrée dans la membrane externe bactérienne et son récepteur Tir induit l'adhésion intime caractéristique des EHEC. Eae est une protéine de 94 kDa codée par le LEE5 sécrétée par la voie générale de sécrétion et non par le SSTT. Tir s'insère dans la membrane externe des entérocytes en formant une épingle à cheveux, laissant libre le domaine extracellulaire de liaison à Eae (**Figure 10**) (Campellone, 2010).

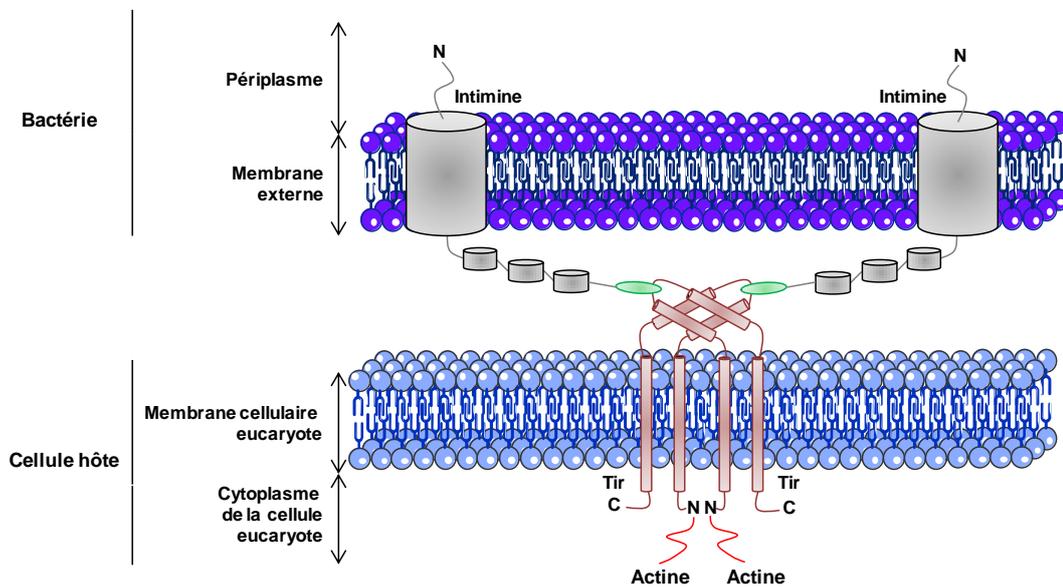


Figure 10 : Structure de la liaison Eae-Tir à l'origine de l'attachement intime entre les EHEC et les entérocytes (D'après (Luo *et al.*, 2000)).

- Rôle des protéines effectrices

Suite à l'adhésion intime, les protéines effectrices sont sécrétées par le SSTT dans la cellule hôte, et engendrent un réarrangement du cytosquelette ainsi que l'apoptose de la cellule hôte (**Figure 11**). Certaines protéines effectrices sécrétées par le SSTT sont codées par le LEE : SepZ, EspH, Map, Tir, EspF. Mais de nombreuses protéines effectrices sont codées par des gènes situés ailleurs dans le génome bactérien, le plus souvent sur des prophages.

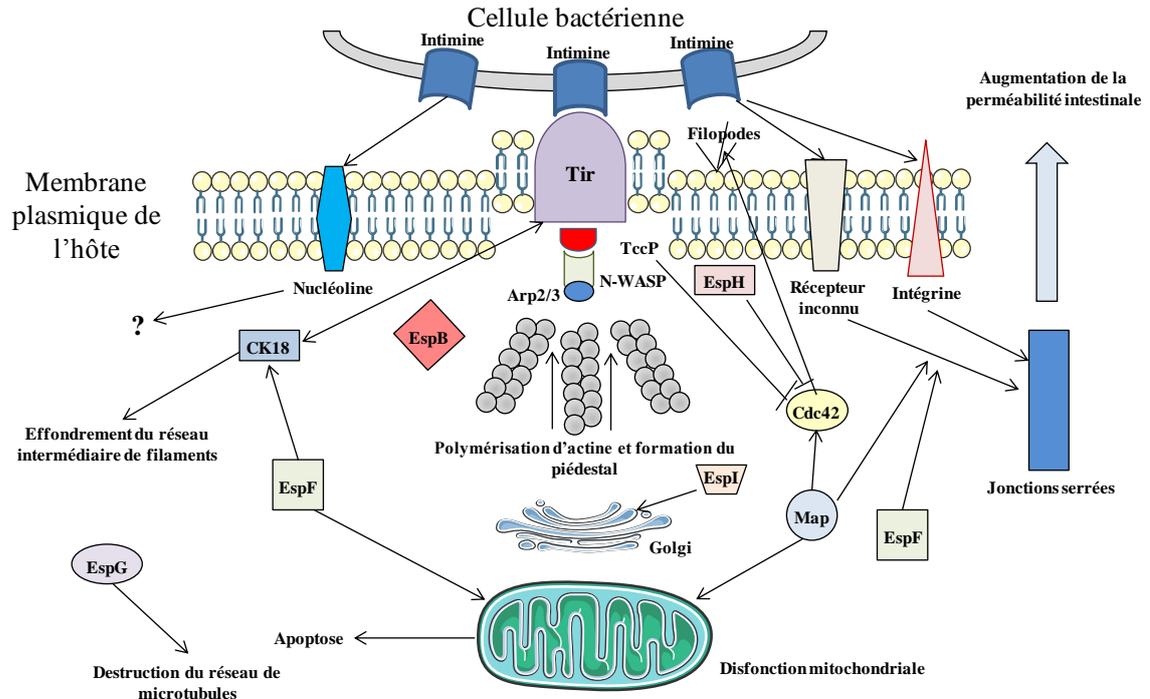


Figure 11 : Fonction des différentes protéines sécrétées par les EHEC au sein de la cellule hôte.

Après sa liaison à l'intimine, Tir dimérise et recrute des protéines eucaryotes N-WASP et Arp2/3. Cela induit la polymérisation de l'actine et par conséquent la formation du piédestal sous la bactérie (Campellone, 2010). L'intimine interagit directement avec la nucléoline. Le rôle de cette interaction n'a pas encore été défini. L'intimine interagit directement avec deux autres récepteurs : une intégrine et un récepteur inconnu, qui agissent sur les jonctions serrées et les déstabilisent. EspF et EspG sont impliquées dans le réarrangement du cytosquelette et dans la formation du piédestal sous la bactérie (Deng *et al.*, 2004 ; Garmendia *et al.*, 2004). EspI cible l'appareil de Golgi, alors que Map et EspF ciblent les mitochondries et favorisent alors l'apoptose de la cellule eucaryote (Deng *et al.*, 2004 ; Viswanathan & Hecht, 2000). Map et EspF sont également responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale par destruction des jonctions serrées (Crane *et al.*, 2001).

D'autres protéines effectrices jouent un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire induite par les EHEC chez l'Homme. C'est le cas de NleC, NleE ou NleH1 (Gao *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011 ; Yen *et al.*, 2010).

Le rôle de la protéine SepZ n'a pas encore été défini.

2.2.2. Régulation du LEE et du SSTT

L'expression des facteurs de virulence bactériens est finement régulée. Cela permet aux bactéries pathogènes de n'exprimer leur facteurs de virulence que lorsque les conditions environnementales sont optimales, par souci d'économie d'énergie, mais également pour ne pas coloniser dans un environnement défavorable, ou encore afin d'empêcher une réponse immunitaire précoce qui compromettrait le processus d'infection.

Ainsi la régulation de l'expression du SSTT chez les EHEC O157:H7 est très complexe. Elle met en jeu des régulateurs codés par le LEE lui-même, mais également des régulateurs globaux du métabolisme cellulaire. On retrouve aussi des gènes régulateurs acquis par transfert horizontal, le plus souvent portés par des prophages. Je décrirai ci-dessous l'action des régulateurs principaux du LEE connus à ce jour chez les EHEC O157:H7.

Régulation par H-NS

La protéine H-NS est un régulateur global de la transcription chez *E. coli*. Elle est connue pour réprimer l'expression de gènes d'origine étrangère (Navarre *et al.*, 2006). Cette régulation permet aux bactéries de se défendre contre l'ADN étranger qui, exprimé de façon non contrôlée, pourrait engendrer des dommages et être létal pour la bactérie. H-NS est une protéine de 15.5 kDa qui possède en région C-terminale un domaine de fixation à l'ADN. Le LEE est une région génomique acquise par transfert horizontal dont l'expression est réprimée par H-NS. Plus précisément, H-NS se fixe directement sur les différents promoteurs du LEE, codant pour les éléments nécessaires aux lésions A/E, afin d'en réprimer leur expression (Mellies *et al.*, 2007; Umanski *et al.*, 2002). H-NS réprime l'expression de *ler* à 27°C, mais pas à 37°C (Umanski *et al.*, 2002).

Régulation par Ler (LEE encoded regulator)

Une souche d'EHEC délétée pour le gène *ler*, le premier gène du LEE1, n'est plus capable de former de lésions A/E car Ler est l'activateur principal des opérons du LEE (Elliott *et al.*, 2000 ; Hacker & Kaper, 2000 ; Mellies *et al.*, 1999 ; Sperandio *et al.*, 2002). Ler dimérise et se fixe directement sur les régions promotrices des différents opérons du LEE. Les mécanismes moléculaires par lesquels Ler favorise la transcription des différents opérons du LEE n'ont pas encore été établis, mais il semblerait que l'activation de l'expression du LEE2 à LEE4 par Ler soit la conséquence de l'antagonisme entre Ler et le répresseur H-NS (Mellies *et al.*, 2007). En effet, Ler présente des similarités de séquence avec la protéine H-NS dans sa région C-terminale, qui serait le domaine de liaison à l'ADN (Sperandio *et al.*, 2000). Cependant, l'affinité de Ler

pour les différents promoteurs du LEE est plus importante que celle de H-NS. Lorsque la concentration en protéine Ler augmente, elle va se fixer sur les différents promoteurs du LEE, favorisant ainsi le détachement de la protéine H-NS. L'expression des opérons du LEE n'est plus réprimée, on observe par conséquent une activation de l'expression des différents opérons. D'autre part, Ler est également activateur de l'expression du LEE5 indépendamment de H-NS, puisque son site de fixation permet son interaction avec l'ARN polymérase qui transcrit alors l'expression du LEE5 (Umanski *et al.*, 2002).

En plus de son rôle dans l'activation de l'expression des différents opérons du LEE, Ler active l'expression d'autres gènes codés par le LEE, tels *grlRA*, *espG* et *map*. Il régule également l'expression de gènes portés par des prophages ou par le plasmide pO157 hébergé par les souches O157:H7, comme *stcE* codant une metalloprotéase ou les gènes *lpf* codant pour les long polar fimbriae (Mellies *et al.*, 2007). D'autre part, Ler réprime sa propre expression dans certaines conditions, ce qui suggère que les concentrations locales de Ler au niveau du promoteur LEE1 sont probablement importantes pour la régulation du LEE (Berdichevsky *et al.*, 2005 ; Mellies *et al.*, 2008 ; Mellies *et al.*, 2011). L'affinité de Ler pour le promoteur du LEE1 est plus faible que pour les promoteurs du LEE2 et LEE3. Ces résultats montrent que l'auto-répression de Ler sur le promoteur du LEE1 se produit lorsque Ler est présent en trop forte concentration, afin d'éviter que la production du SSTT soit trop importante pour la bactérie.

Ler étant l'activateur principal des autres opérons du LEE, la plupart des régulateurs du LEE régulent l'expression de *ler*, et ce sont généralement les concentrations de Ler qui définissent le taux d'expression du LEE.

Régulation par *GrlA/R* (Global Regulator LEE Activator and Repressor)

Juste en aval du LEE1 est situé l'opéron *grlR/A*, codant pour une protéine répresseur et une protéine activatrice de l'expression de *ler* (Deng *et al.*, 2004). Il existe une boucle de régulation entre *ler* et l'opéron *grlR/A*. En effet, Ler active l'expression de l'opéron *grlR/A*, la protéine GrlR réprime l'expression de *ler*, mais également l'activité de GrlA, de façon post-traductionnelle. D'autre part, la protéase ClpX dégrade la protéine GrlR (Iyoda & Watanabe, 2005 ; Iyoda *et al.*, 2006 ; Jobichen *et al.*, 2007). Récemment, il a été montré que GrlA joue un double rôle dans la régulation de l'expression de *ler*. Tout d'abord, il active l'expression de *ler* en empêchant la répression par le régulateur global HN-S. Ensuite, il active directement l'expression de *ler* en favorisant l'interaction entre le promoteur de *ler* et l'ARN polymérase (Bustamante *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2011).

Régulation par les protéines Pch

Chez les EHEC, les gènes *pch* (*perC* homologue) possèdent plusieurs homologues. Chez la souche Sakai, il y a 5 gènes homologues à *perC* : *pchA*, *pchB*, *pchC*, *pchD* et *pchE*, alors que chez la souche EDL933, les analyses bioinformatiques montrent qu'il n'y en a que 4 (Iyoda & Watanabe, 2004). Chez la souche Sakai, les produits des gènes *pchA*, *pchB* et *pchC* sont des activateurs de l'expression de *ler*, et par conséquent, des activateurs de l'expression des autres opérons du LEE (Iyoda & Watanabe, 2004). Il est important de noter que les effets de PchA et PchB sur la régulation de l'expression du LEE sont plus marqués que l'effet de PchC. De plus, la régulation par les protéines Pch n'a pas encore été étudiée chez la souche EDL933, mais les résultats de recherche de gènes homologues *in silico* ont montré que les gènes *pchA* et *pchB* sont absents du génome d'EDL933. On peut donc émettre l'hypothèse que chez la souche EDL933, la régulation du LEE par les protéines codées par les gènes *pch* ne serait pas aussi marquée que dans la souche Sakai, ou qu'une autre protéine homologue à PerC absente de la souche Sakai prendrait le relai dans la souche EDL933.

Chez la souche EHEC Sakai, LrhA réprime l'expression des gènes *pchA* et *pchB*, et donc l'expression du LEE (Honda *et al.*, 2009).

Régulation par le Quorum Sensing

Le quorum sensing est un système de signalisation intercellulaire par lequel une bactérie appréhende la densité de population des bactéries de son environnement, et régule en réponse l'expression de certains gènes. Cette signalisation requiert généralement la production et la détection d'hormones bactériennes communément appelées auto-inducteurs (AIs). Chez les EHEC, l'expression de plusieurs régulateurs impliqués dans la virulence est sous le contrôle du quorum sensing, et c'est le système stimulé par l'AI-3 qui semble jouer un rôle majeur (Clarke *et al.*, 2006 ; Kendall *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Reading *et al.*, 2007). L'AI-3 peut être substitué par des catécholamines, la norépinéphrine et l'épinéphrine, produites en abondance respectivement par les neurones afférents au tube digestif et par le système nerveux central et déversées dans l'intestin (Sperandio *et al.*, 2003).

Plusieurs régulateurs du quorum sensing régulent l'expression du LEE. Le premier décrit, QseA (Quorum sensing *E. coli* regulator A), est un régulateur transcriptionnel de la famille Lys-R. QseA répondrait à un système à deux composants inconnu à ce jour. Lorsque le système à deux composants capte le signal AI-3, le régulateur QseA active l'expression du LEE *via* Ler (Sperandio *et al.*, 2002). Cette activation de l'expression de *ler* s'effectue par fixation de QseA

sur les deux régions promotrices de *ler* décrites, P1 et P2 respectivement promoteur distal et proximal (Kendall *et al.*, 2010; Sharp & Sperandio, 2007). Plus récemment, un second régulateur du Quorum sensing, QseD, a été décrit comme un répresseur de l'expression de *ler*. Chez les EHEC O157:H7, la protéine QseD réprime l'expression de *ler* en se fixant sur un régulateur de type Lys-R déjà présent sur le promoteur de *ler*. Le régulateur sur lequel se fixe QseD n'a pas été identifié, mais ce n'est ni QseA, ni LrhA (Habdas *et al.*, 2010).

Enfin, les *E. coli* possède une protéine de la famille LuxR, SdiA, impliquée dans le quorum sensing. Les *E. coli* ne possèdent pas de gènes codant pour l'auto-inducteur correspondant (acyl-homoserine-lactone), mais sont capables de répondre au signal produit par d'autres espèces. Chez les EHEC O157:H7, la surexpression de *sdiA* réprime l'expression des gènes du LEE (Kanamaru *et al.*, 2000). Cependant, la délétion de *sdiA* chez la souche EHEC 86-24 n'augmente pas significativement l'expression des différents gènes du LEE (Sharma *et al.*, 2010).

Lorsque les EHEC arrivent dans l'intestin, ils sont présents en faible quantité. Cependant, les AIs sont produits par le microbiote intestinal, et les neurones afférents au tube digestif produisent également des homologues d'AI. Cela a pour conséquence une activation de l'expression des gènes du LEE, suivie de l'adhésion des EHEC (**Figure 12**).

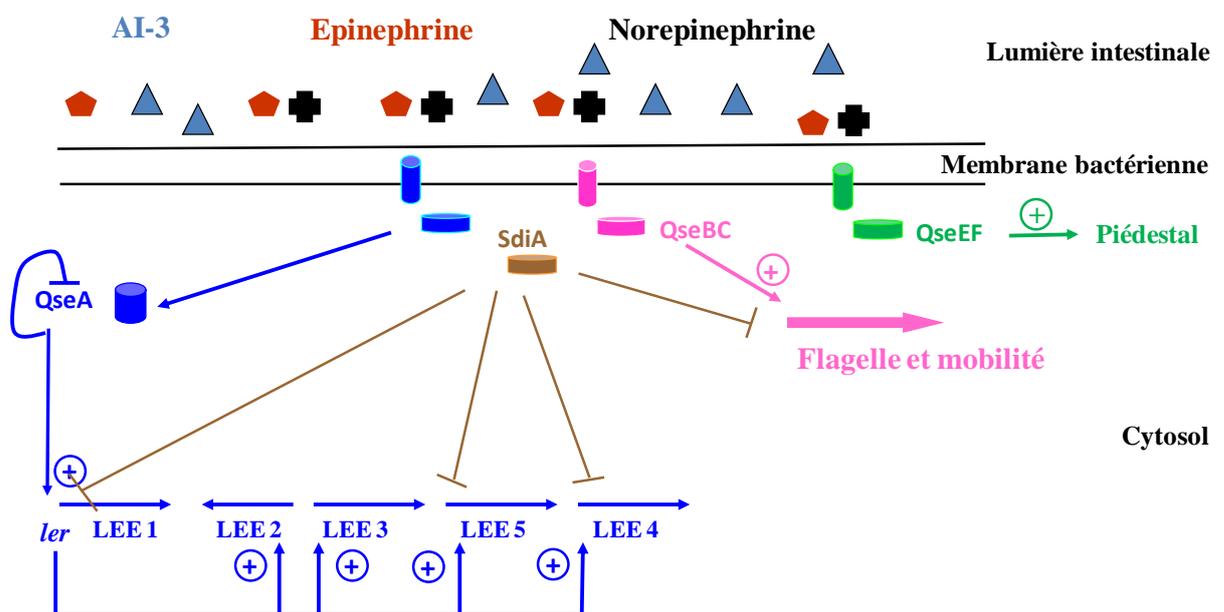


Figure 12 : Activation de l'expression du LEE dans l'intestin par les AIs sécrétés par le microbiote intestinal et les neurones afférents au tube digestif.

Régulation par Hfq

Hfq est une protéine chaperon présente chez de nombreuses espèces bactériennes. Elle agit sur la stabilité des petits ARN non codants et des ARNm. Hfq réprime la traduction des protéines

codées par le LEE chez les EHEC O157:H7. En phase exponentielle de croissance, Hfq réprime la synthèse de GrlA et GrlR, ce qui conduit à la répression de l'expression de *ler*, et donc de l'expression des autres opérons du LEE (Hansen & Kaper, 2009). En phase stationnaire, il semble que la répression de la synthèse des protéines codées par le LEE par Hfq soit indépendante de GrlA et GrlR. Hfq agit alors directement sur la stabilité des ARNm de *ler*, du LEE4 et du LEE5 (Hansen & Kaper, 2009; Shakhnovich *et al.*, 2009).

Régulation par GadE et YhiF

GadE est le régulateur principal de la résistance à l'acidité chez les EHEC O157:H7. Comme GadE, YhiF est codée par l'AFI, mais son rôle dans la résistance à l'acidité est encore inconnu. Sa séquence protéique présente 23% d'identité avec celle de GadE (Tatsuno *et al.*, 2003) et possède en C-terminal un motif « helix-turn-helix » impliqué dans la fixation à l'ADN, ce qui suggère une activité de régulateur transcriptionnel. Chez les EHEC O157:H7, GadE et YhiF inhibent l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Tatsuno *et al.*, 2003). Cette inhibition est due à la répression par GadE et YhiF de la synthèse des protéines codées par le LEE (Tree *et al.*, 2011). *In vitro*, GadE se fixe sur les promoteurs des LEE1, LEE2 et LEE3. L'interaction entre GadE et les promoteurs des LEE4 et LEE5 n'a pas été étudiée, et aucune étude *in vivo* n'a été effectuée. La cascade de régulation du LEE par GadE et YhiF n'a pas été déterminée mais les résultats montrent que ces deux protéines répriment l'expression des gènes du LEE par la même voie de régulation (Tree *et al.*, 2011). Le rôle de Ler dans la répression du LEE par GadE et YhiF est controversé. En effet, alors qu'un groupe avait montré que GadE et YhiF réprimaient directement l'expression du LEE4 et du LEE5 indépendamment de Ler (Tatsuno *et al.*, 2003), les résultats obtenus par un deuxième groupe suggéraient que Ler était impliqué dans la cascade de régulation du LEE par GadE et YhiF (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Une étude plus récente a montré que GadE et YhiF réprimaient légèrement l'expression de *ler* alors qu'ils réprimaient fortement l'expression du LEE2 et du LEE3. De plus, il a été montré *in vitro* que GadE se fixe avec plus d'affinité au promoteur du LEE1 qu'à la région promotrice du LEE2/3 (Tree *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que GadE et YhiF répriment directement le LEE2/3 indépendamment de Ler. Cependant, les mécanismes de régulation du LEE par GadE et YhiF ne sont pas caractérisés.

Les autres régulateurs de l'expression du LEE

Le LEE est un îlot de pathogénicité dont l'expression est régulée par les nombreuses molécules citées ci-dessus, mais également par d'autres molécules. Parmi elles, on retrouve

notamment les protéines EtrA et EivF, non codées par le LEE, qui répriment l'expression de l'opéron *grlRA* et par conséquent celle du LEE (Zhang *et al.*, 2004). Les protéines PsrA et PsrB sont également des répresseurs de l'expression du LEE car elles activent l'expression de *gadE* (Tree *et al.*, 2011). La protéine IHF active l'expression de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999) alors que HhA la réprime en se fixant directement sur l'ADN ou en dimérisant avec HN-S (Sharma & Zuerner, 2004). La protéine ToxB est également un inducteur de l'adhésion des EHEC en favorisant la production et/ou la sécrétion des protéines du SSTT (Tatsuno *et al.*, 2001). Une étude récente a montré que la protéine RgdR, codée par l'OI-51 est un activateur de l'expression du LEE (Flockhart *et al.*, 2012). Le petit ARN non codant DsrA active également l'expression de *ler*. Cette activation requiert le facteur σ^S (Laaberki *et al.*, 2006).

Conclusions sur la régulation de l'expression des gènes du LEE

La complexité des régulations exercées sur l'expression des différents gènes du LEE montrent que l'expression et la mise en place du SSTT répond à différents facteurs environnementaux tels la température, le pH, les molécules rencontrées dans le côlon, etc. Ceci assure l'adhésion des EHEC dans le bon compartiment chez l'hôte et au bon moment pour favoriser l'implantation et la pathogénicité des EHEC.

2.3.La production de Shiga toxines

Un des facteurs de virulence principaux des EHEC est la production de Stx. En effet, ce sont elles qui sont responsables des symptômes hémorragiques, du SHU et du PTT. Les Stx ne faisant pas l'objet de ce travail de thèse, nous décrirons succinctement leur synthèse ainsi que leur mode d'action. Il existe deux types de Stx : Stx1 et Stx2. Ces toxines présentent des homologies de séquence avec la toxine de type I de *Shigella dysenteriae* (O'Brien *et al.*, 1983 ; Strockbine *et al.*, 1988). Les études épidémiologiques indiquent que les souches produisant uniquement Stx2 sont plus virulentes que les souches produisant uniquement Stx1 ou Stx2 et Stx1.

Les Stx sont des toxines de type A-B, constituées d'une sous-unité A (active) de 33 kDa qui porte l'activité catalytique, et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7 kDa qui permettent la fixation de la Stx sur son récepteur Gb3 (globotriosyl céramide 3) (O'Brien & Holmes, 1987).

Les EHEC produisent les Stx dans l'intestin. Celles-ci traversent la barrière épithéliale intestinale, puis stimulent les cellules du système immunitaire, favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et la synthèse du récepteur des Stx, Gb3, par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. La fixation des Stx sur leur récepteur induit l'arrêt de la synthèse protéique par N-glycosylation de l'ARNr 28S de la sous-unité 60S du ribosome (**Figure**

13). Ceci provoque une thrombose au niveau des capillaires sanguins de l'intestin, causant une colite hémorragique, du cerveau, causant le PTT, et du rein, causant le SHU, ces organes étant particulièrement riches en récepteurs Gb3 (**Figure 13**).

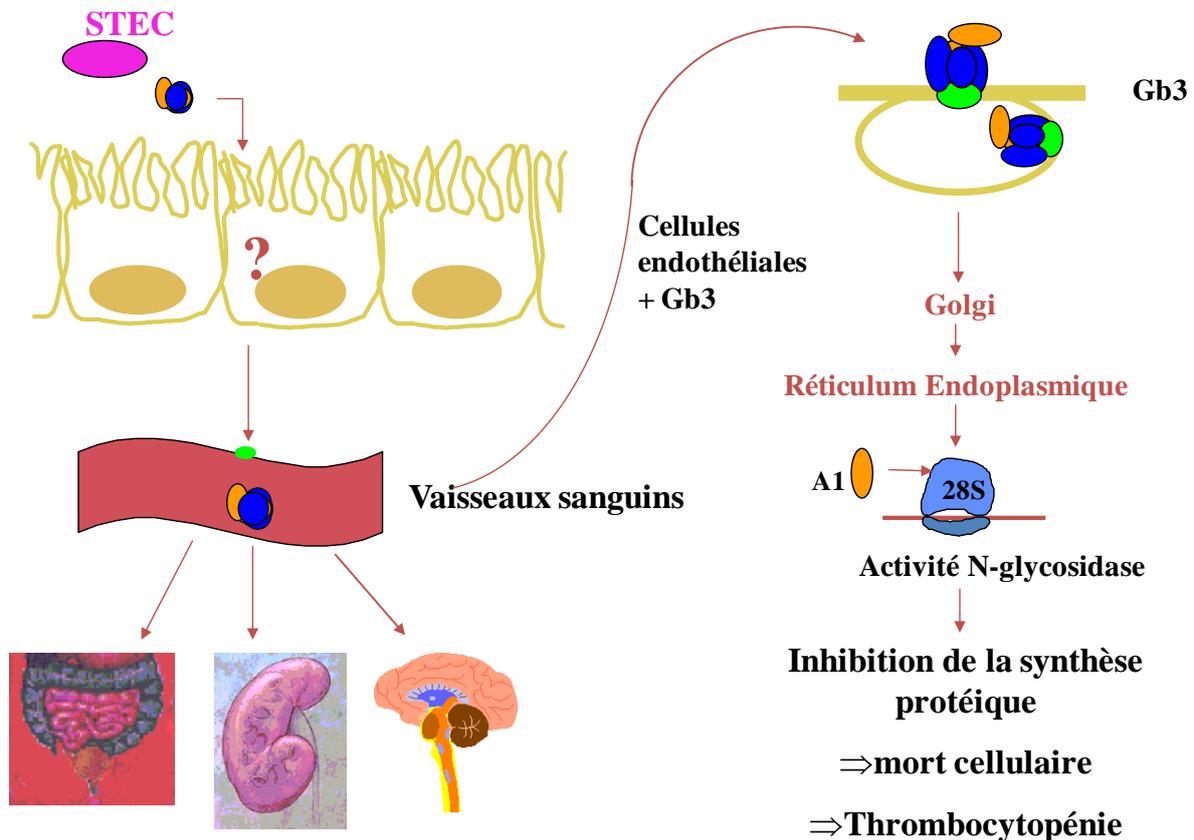


Figure 13 : Mécanisme d'entrée de la Stx dans le système sanguin. Les Stx pénètrent dans l'hôte à partir de la lumière intestinale, lieu de colonisation des EHEC, à travers les cellules épithéliales, vraisemblablement par la voie paracellulaire. Les Stx agissent directement sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, avant de rejoindre la circulation systémique. Par la suite, les Stx se fixent sur leurs récepteurs au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les Stx sont internalisées dans la cellule hôte et conduisent à l'inhibition de la synthèse protéique puis à l'apoptose de la cellule.

Chez les EHEC O157:H7, les gènes codant pour Stx2 sont portés par un prophage de type Lambda et exprimés sous le contrôle du promoteur tardif du phage (O'Brien *et al.*, 1984 ; Scotland *et al.*, 1983). Lorsque la cellule bactérienne est soumise à un stress qui occasionne des dommages à l'ADN, la réponse SOS est activée et induit la phase lytique du phage Stx2.

Le régulateur majeur de la réponse SOS est RecA, protéine présente de façon constante dans la cellule. RecA se fixe sur l'ADN endommagé simple brin et acquiert alors une activité co-protéase qui permet l'auto-clivage du répresseur LexA, ce qui conduit à l'expression des gènes

de réparation de l'ADN jusqu'alors réprimés par LexA. RecA induit également l'auto-clivage du répresseur cI du phage Lambda, ce qui conduit à l'expression des gènes phagiques et en particulier des gènes *stx2*, et à la synthèse des protéines correspondantes par la machinerie bactérienne. Une protéine phagique lyse la cellule bactérienne, les nouvelles particules phagiques sont ainsi libérées dans le milieu ainsi que les molécules Stx2 (**Figure 13**). Bien que les gènes *stx1* soient également portés par un prophage de type Lambda, l'expression des gènes *stx1* n'est pas affectée par le système SOS, suggérant que les gènes *stx1* sont portés par un prophage défectif ou soumis à une régulation différente (Fuchs *et al.*, 1999 ; Ritchie *et al.*, 2003).

3. Le monoxyde d'azote

3.1. Généralités

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule radicalaire labile, faisant partie de la famille des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Il a été identifié en 1967 comme un produit biologique intermédiaire à la dénitrification chez l'espèce bactérienne marine *Pseudomonas perfectomarinus* (Barbaree & Payne, 1967). Le NO est composé d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote liés de façon covalente. Il possède un électron célibataire qui lui confère son état radicalaire et favorise une forte réactivité sur des composés organiques et inorganiques. Le potentiel d'oxydoréduction du milieu environnant détermine l'oxydation du NO en cation nitrosium (NO⁺) ou sa réduction en anion nitrosyl (NO⁻). Contrairement à la plupart des radicaux libres, le NO ne se dimérise et ne se dismute pas, mais il est capable de partager son électron célibataire avec de nombreuses molécules. Par exemple, le NO est capable de réagir avec d'autres radicaux libres comme l'oxygène et l'anion superoxide présents dans le microenvironnement. De cette façon, des espèces réactives de l'azote secondaires sont formées comme le trioxyde d'azote (N₂O₃) ou encore le peroxydinitrite (ONOO⁻) (Reiter, 2006). D'autre part, le NO peut interagir directement avec des molécules contenant du fer comme l'hème, les noyaux fer-soufre ainsi que les cofacteurs de type métaux. C'est un effecteur allostérique qui induit généralement une inactivité de la protéine sur laquelle il se fixe (Fang, 2004). Toutes ces réactions chimiques confèrent au NO de nombreuses propriétés biochimiques, l'impliquant dans de nombreuses fonctions biologiques (Cooper, 1999) (**Figure 14**). La forte réactivité du NO avec le fer et les composés oxygénés implique que sa disponibilité dans les tissus riches en hème ou oxygène est brève comme dans les vaisseaux sanguins par exemple. Généralement, son action est exercée sur les cellules avoisinant celles qui le produisent au moment de sa synthèse (Ignarro

et al., 1993). Le NO est liposoluble, ce qui lui permet de diffuser facilement à travers les membranes cellulaires (Subczynski *et al.*, 1996).

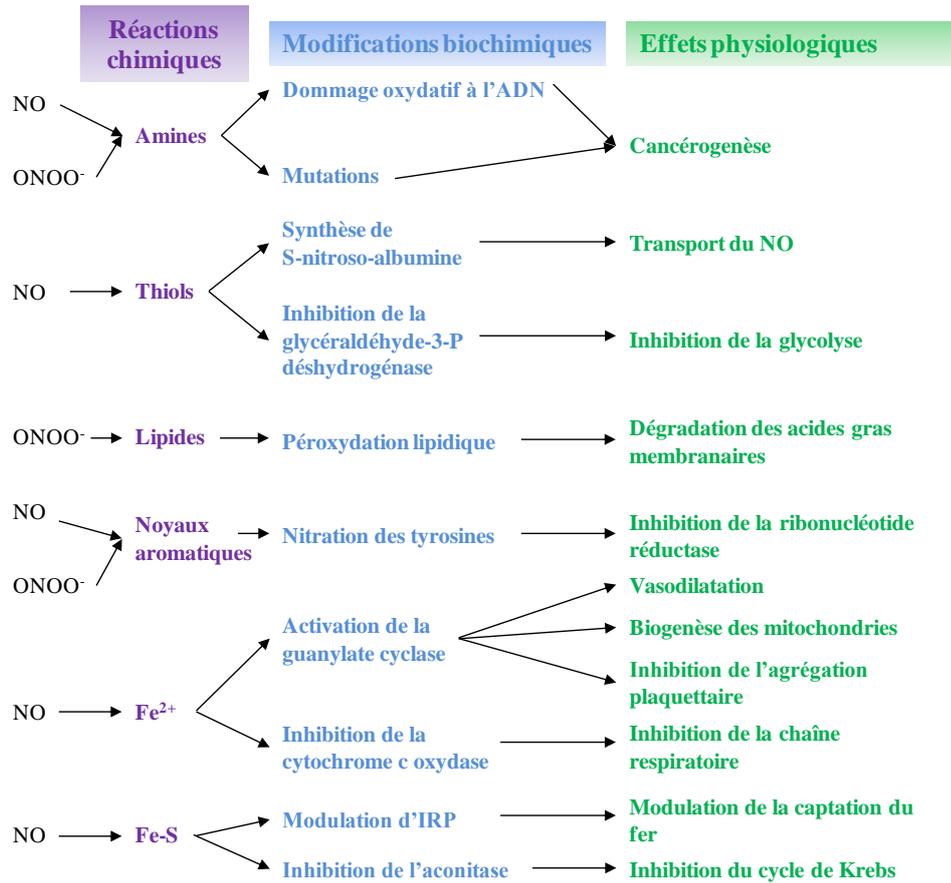


Figure 14 : Principales propriétés chimiques et biochimiques du NO, ainsi que les principales fonctions physiologiques touchées.

Le NO est produit par de nombreuses espèces bactériennes, les plantes et les animaux de différentes façons. Il peut être synthétisé par des voies non spécifiques qui produisent du NO par la dégradation ou la synthèse d'autres composés, comme par exemple la conversion des nitrites par les nitrates réductases lorsque les nitrates sont présents en faible concentration (Yamasaki & Sakihama, 2000). Le NO peut être également produit par des enzymes dédiées à sa synthèse comme les NO Synthases (NOS). Ces enzymes ne sont pas présentes chez toutes les espèces. En effet, on les retrouve majoritairement chez les animaux, mais il existe des bactéries et des Archae qui possèdent des gènes codant pour des protéines possédant des homologies avec un domaine des NOS retrouvées chez les animaux (Raman *et al.*, 2000).

3.2.Synthèse du NO par les cellules eucaryotes

Chez les animaux, la production de NO se fait notamment par l'activité des NOS. Les NOS produisent le NO à partir de L-arginine en deux étapes : une première étape dite de monooxydation du substrat L-arginine en L-hydroxy-arginine, et une deuxième étape qui ne nécessite qu'un électron célibataire pour la réaction chimique mais où l'activation par l'oxygène est importante. Le L-citrulline est alors produit ainsi qu'une molécule de NO (Griffith & Stuehr, 1995) (**Figure 15**).

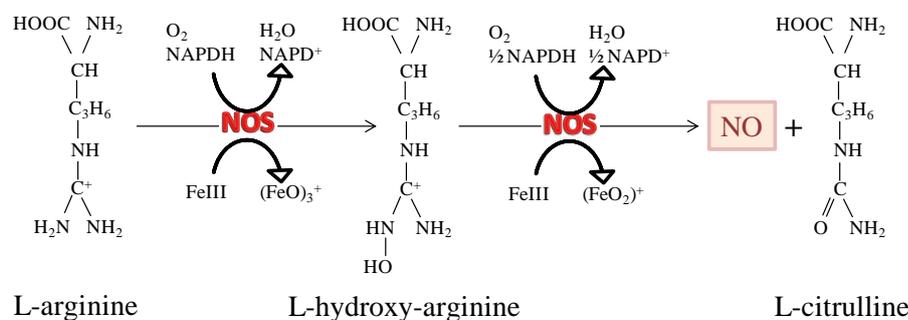


Figure 15 : Synthèse enzymatique de NO. Les NOS synthétisent le NO à partir de L-arginine en deux étapes en consommant du NAPDH et de l'O₂.

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de NOS : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inducible (iNOS). Généralement, eNOS et nNOS sont exprimées constitutivement, alors que l'expression de iNOS est induite par les cytokines pro-inflammatoires ainsi que par certains peptides bactériens (Suchner *et al.*, 2000). La eNOS et la nNOS sont calmoduline dépendantes et produisent de faibles quantités de NO de l'ordre du pmole/min/mg de protéine sur des périodes brèves. La eNOS est produite par les cellules des vaisseaux sanguins alors que la nNOS est produite par les cellules du système nerveux central, par les cellules des muscles squelettiques ainsi que par le muscle cardiaque. La iNOS, quant à elle, est produite par de nombreux types cellulaires comme par exemple les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les hépatocytes ou encore les astrocytes. La synthèse de la iNOS, induite notamment lors d'une infection bactérienne, permet la production de plus grosses quantités de NO, de l'ordre du $\mu\text{mole/min/mg}$ de protéine pendant de plus longues périodes que la eNOS et la nNOS.

3.2.1. Régulation de l'expression de la iNOS

Le niveau d'expression de la iNOS dépend de plusieurs facteurs, notamment du stimulus utilisé, du type de cellule, ou encore de l'origine animale des cellules activées. NF- κ B (pour

Nuclear Factor kappa B) est un facteur de transcription important dans la réponse immunitaire, présent constitutivement dans la cellule, mais lié à l'inhibiteur I- κ B lorsque la cellule n'est pas activée, ce qui le séquestre dans le cytoplasme et l'empêche d'activer l'expression des gènes. NF- κ B est une protéine composée de deux sous-unités. Ces sous-unités diffèrent en fonction des cibles transcriptionnelles. Lors d'une infection, les cellules sont activées par la fixation de différents types de particules (microbiennes, cytokines, ADN endommagé, molécules toxiques) (May & Ghosh, 1997). Cette activation induit une cascade de phosphorylation qui engendre la dégradation de I- κ B. Cette dégradation permet à NF- κ B d'être libéré et activé. Il se dirige alors dans le noyau de la cellule pour activer l'expression des gènes cibles. Dans un modèle murin, l'inhibition de la voie NF- κ B empêche l'expression du gène *nos-2*, suggérant que ce facteur de transcription est un élément essentiel pour la transcription du gène codant pour la iNOS (Ganster *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 1993).

La voie IFN- γ /JAK-2/STAT-1 peut également activer l'expression du gène *nos-2* chez les rongeurs et chez l'Homme (Singh *et al.*, 1996 ; Stempelj *et al.*, 2007) (**Figure 16**). Lorsqu'il y a une inflammation, l'activation des cellules entraîne la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comme par exemple l'IFN- γ . Les cytokines sont libérées dans l'environnement extracellulaire et se fixent sur des récepteurs spécifiques. Cette fixation entraîne une activation de la voie JAK-2/STAT-1. STAT-1, phosphorylée par JAK-2, dimérise et le complexe se dirige alors dans le noyau et active la transcription de *nos-2* en se fixant directement sur le promoteur de ce dernier *via* les sites spécifiques de fixation de STAT-1 (Gao *et al.*, 1997).

Inflammation

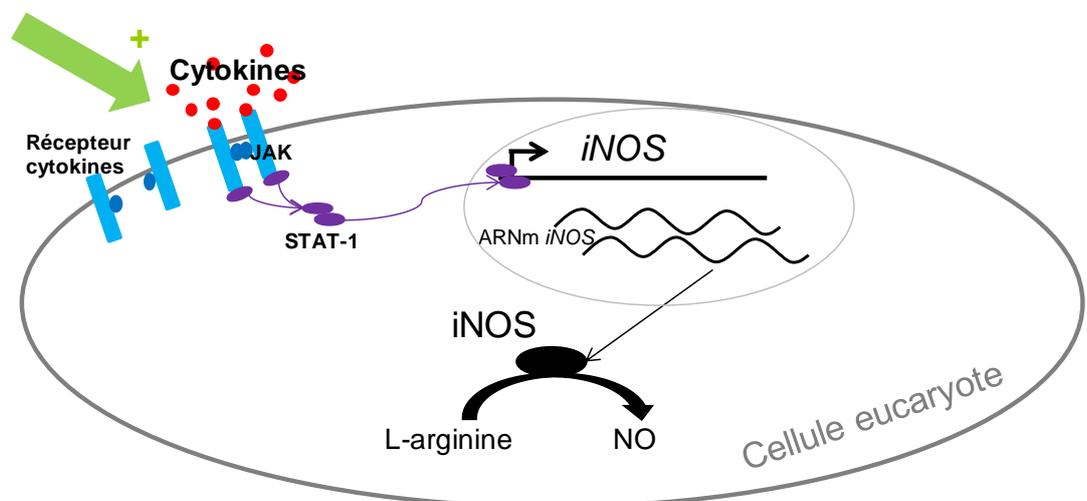


Figure 16 : Modulation de la production de NO durant l'inflammation.

L'expression de la iNOS est également régulée post-transcriptionnellement. En effet, la iNOS est fonctionnelle sous forme homodimérique, et la formation du dimère dépend des cofacteurs NADPH, FAD, FMN et BH₄ (Kolodziejcki *et al.*, 2003).

3.2.2. Modulation de la production de NO par la L-arginine

Les NOS produisent le NO à partir de L-arginine. Cependant, la L-arginine est un substrat qui peut être métabolisé par différentes enzymes en fonction des besoins de la cellule. En effet, la L-arginine est le substrat de la iNOS pour la synthèse de L-citrulline et NO, mais elle est aussi le substrat de l'arginase dont il existe deux isoformes qui hydrolysent la L-arginine en urée et ornithine (**Figure 17**). L'arginase I est une enzyme cytosolique colocalisée avec l'ornithine décarboxylase (ODC). L'ODC dégrade l'ornithine produite par l'activité de l'arginase I en polyamines essentielles pour la prolifération et la différenciation cellulaire. L'arginase II quant à elle colocalise avec l'ornithine aminotransférase (OAT) au niveau mitochondrial. L'OAT hydrolyse l'ornithine produite par l'activité de l'arginase II en proline et glutamate, indispensables à la synthèse du collagène du tissu conjonctif (Li *et al.*, 2001; Wu & Morris, 1998). Lorsque l'arginase et la iNOS sont exprimées ensemble dans des cellules activées, la L-arginine en concentration physiologique est métabolisée principalement par l'arginase. Ainsi, bien qu'exprimant la iNOS, les cellules ne produisent pas de NO (Gobert *et al.*, 2000).

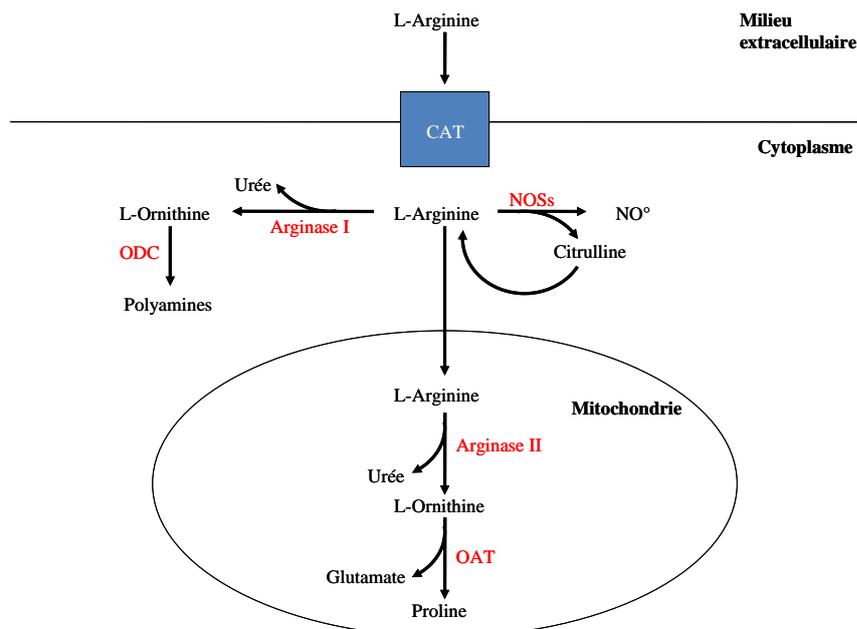


Figure 17 : Métabolisme cellulaire de l'arginine. CAT : cationic amino-acid transporter ; ODC : ornithine décarboxylase ; OAT : ornithine aminotransférase ; NO^o : monoxyde d'azote ; NOSs : Nitric oxide synthases (D'après (Li *et al.*, 2001)).

D'autre part, les polyamines synthétisées par l'ODC à partir de l'ornithine produite par l'arginase I inhibent la traduction des ARNm de la iNOS (Bussiere *et al.*, 2005).

3.3.Principales fonctions physiologiques du NO

La première description du rôle du NO l'a été dans le système cardio-vasculaire. Le NO produit par les cellules endothéliales diffuse à travers les membranes et pénètre dans les cellules musculaires lisses où il active la guanylate cyclase. L'augmentation de la concentration intracellulaire en GMPc qui en résulte induit un relâchement des fibres musculaires, provoquant une vasodilatation. L'ensemble des travaux démontrant le rôle du NO dans le système cardio-vasculaire a permis à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferris Murad d'obtenir le prix Nobel de Médecine en 1998.

Cette découverte a été à l'origine de nombreuses avancées thérapeutiques, notamment en ce qui concerne les maladies cardio-vasculaires et respiratoires (Cannon, 1998). Le NO a alors été le premier gaz à usage thérapeutique contre notamment l'hypertension artérielle, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la bronchopneumonie chronique obstructive ou encore le syndrome d'hypertension artérielle pulmonaire du nouveau-né.

La voie métabolique NO/GMPc joue également un rôle important dans l'érection. En effet, le GMPc est important pour le maintien de la pression intra-caverneuse du pénis. Le GMPc est synthétisé par les guanylyl cyclases qui sont entre autre activées par le NO. Il est dégradé par les phosphodiesterases. Ainsi, un effet NO-mimétique est réalisé en administrant des molécules inhibitrices de la dégradation du GMPc, notamment avec le Sildenafil (Viagra) qui favorise l'érection en empêchant la dégradation du GMPc (Glossmann *et al.*, 1999).

Enfin, le NO est un agent clé de la réponse immune innée. Lors d'une infection bactérienne par exemple, les LPS bactériens activent la production de cytokines et d'interférons par le système immunitaire, qui induisent alors la production de NO par différents types cellulaires. En présence de l'anion superoxide, le NO réagit avec ce dernier produisant ainsi du peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite est un composé au fort pouvoir oxydant, à l'origine de modifications de protéines, de lipides et des acides nucléiques bactériens. D'autre part, le NO réagit avec les centres fers de certaines protéines nécessaires à la survie bactérienne, engendrant ainsi la mort de la bactérie (Nathan & Shiloh, 2000).

3.4.La réponse bactérienne au NO

L'activité antibactérienne du NO est due à son activité anti-proliférative et cytotoxique sur certains agents pathogènes. Cependant, en concentrations physiologiques le NO n'affecte pas la

survie des bactéries *Escherichia coli* (Brunelli *et al.*, 1995) ni de *Citrobacter rodentium* (Vallance *et al.*, 2002). Cette survie des bactéries observée en présence de NO peut s'expliquer par l'acquisition de mécanismes de détection et de résistance au NO.

3.4.1. Les systèmes de détoxification du NO

Les *E. coli* ont développé des systèmes de détoxification du NO. Certains systèmes utilisent des NO réductases (NORs) qui réduisent le NO en N₂O. D'autres expriment également des NO dioxygénases (NODs) qui utilisent O₂ pour convertir le NO en nitrate. Les *E. coli* utilisent les deux types d'enzymes pour la détoxification du NO.

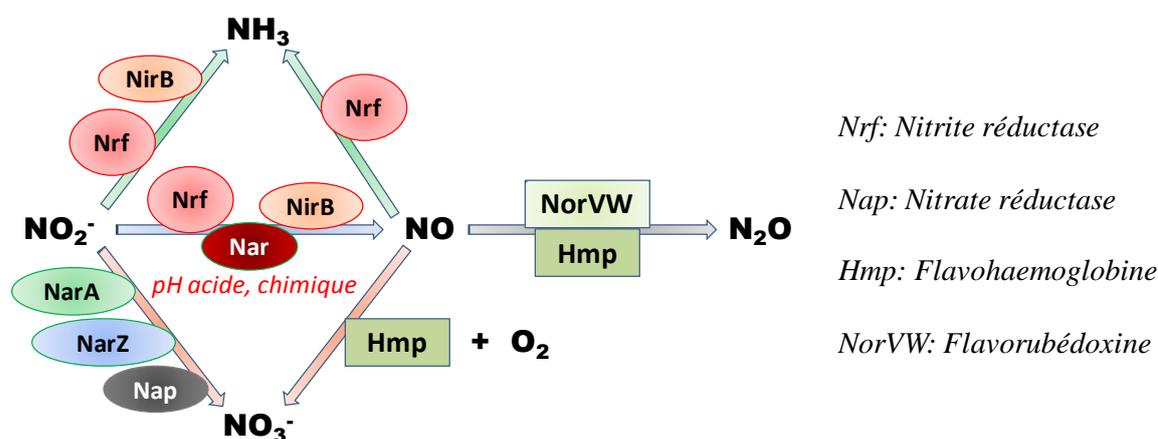


Figure 18 : Système de détoxification du NO chez les *Escherichia coli*.

Trois systèmes principaux de détoxification du NO chez les *E. coli* ont été identifiés: la cytochrome *c* nitrite réductase (NrfA), la flavohémoglobine (Hmp) et la flavorubrédoxine codée par le gène *norV*. Ces enzymes utilisent le NO ou ses dérivés comme substrat et produisent des molécules non toxiques pour les bactéries.

La cytochrome c nitrite réductase

La cytochrome *c* nitrite réductase est codée par le gène *nrfA*. NrfA est une nitrite réductase périplasmique qui joue un rôle important dans la détoxification du NO chez *E. coli*, principalement en conditions anaérobies (Poock *et al.*, 2002). *In vitro* NrfA ou ses homologues sont capables de réduire les nitrites en ion ammonium et de produire des intermédiaires qui permettent la détoxification du NO ou de l'hydroxylamine (Einsle *et al.*, 2002). L'expression de *nrfA* est réprimée par NsrR principalement (Filenko *et al.*, 2007).

La flavohémoglobine

La flavohémoglobine est codée par le gène *hmp*. Il est induit par le NO et les agents nitrosants *via* le régulateur clé NsrR (Bodenmiller & Spiro, 2006), et serait principalement

responsable de la détoxification du NO en présence d'oxygène. En effet, en présence d'oxygène, l'affinité de Hmp pour le NO est beaucoup plus importante qu'en son absence, l'oxygène étant utilisé pour la réaction de détoxification du NO en nitrate (Hausladen *et al.*, 2001). NsrR réprime l'expression du gène *hmp* en absence de NO en se fixant directement sur le promoteur de *hmp* (Partridge *et al.*, 2009).

La flavorubrédoxine

La flavorubrédoxine (FIRd) est une réductase qui contribue à la détoxification du NO en anaérobiose. Elle est codée par le gène *norV*, dont l'expression est activée par NorR. En présence de NO, la protéine FIRd est produite. Son association avec l'oxidoréductase NorW permet la détoxification du NO en N₂O ou NO⁻.

3.4.2. Les protéines régulatrices de la dénitrification du NO

Il existe deux types de protéines impliquées dans la détoxification du NO chez les bactéries : i) les protéines dont le principal rôle n'est pas de capter le NO mais qui possèdent des résidus qui peuvent être nitrosylés ; ii) les protéines dédiées à la réponse au NO, qui captent le NO et régulent en conséquence la synthèse de protéines impliquées dans la détoxification du NO.

Parmi les protéines appartenant à la première classe, on retrouve le régulateur des fumarate et nitrate réductases Fnr (Fumarate nitrate réduction), un régulateur global qui contient un cluster de type fer-sulfure [4Fe-4S]. Le rôle majeur de Fnr est de capter l'oxygène et de réguler l'expression des gènes impliqués dans l'anaérobiose en fonction de l'oxygène disponible (Crack *et al.*, 2004). Cependant, il a été montré que Fnr est capable de capter le NO et d'induire sa détoxification chez différentes espèces bactériennes comme *Escherichia coli* (Crack *et al.*, 2008 ; Cruz-Ramos *et al.*, 2002), *Salmonella Typhimurium* (Gilberthorpe & Poole, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Wu *et al.*, 2000) et *Paracoccus denitrificans* (Hutchings *et al.*, 2002). De la même façon, SoxR et IscR sont deux protéines dont le rôle principal est de réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Cependant, elles possèdent des clusters fer-sulfure [2Fe-2S] qui permettent la fixation du NO. Une fois le NO fixé, SoxR et IscR favorisent sa détoxification (Hyduke *et al.*, 2007 ; Jones-Carson *et al.*, 2008; Pullan *et al.*, 2007). Il est cependant important de noter 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*, leur activation par des concentrations physiologiques de NO n'a pas été démontrée.

Parmi la deuxième classe de protéines, on retrouve les régulateurs NorR, NsrR, et Nnr (Nitrate reductase regulator). Le rôle de NorR et NsrR sera expliqué plus en détail dans le paragraphe suivant. Nnr est retrouvé principalement chez les bactéries dénitrificatrices du sol. C'est un facteur de transcription de la superfamille des Fnr-Crp, qui active l'expression de gènes codant pour des nitrites réductase et NO réductase en réponse au NO (Hutchings *et al.*, 2000).

Chez *E. coli*, les senseurs de NO sont NorR et NsrR.

NorR

NorR (pour NO-responsive regulator) est une protéine codée par *norR*. C'est un senseur de NO dépendant de σ^{54} (RpoN). Il est connu pour être un activateur de l'expression des gènes cibles en présence de NO et fait partie de la famille protéique « enhancer binding protein ». NorR possède 3 domaines : i) un domaine C-terminal qui permet la fixation de la protéine à l'ADN, ii) un domaine central qui possède une activité ATPase et permet l'interaction avec σ^{54} , et iii) une région N-terminale qui possède un domaine GAF permettant la détection du NO. La fixation du NO sur NorR s'effectue sur la molécule Fe^{2+} du résidu aspartate en position 99 (D'Autreaux *et al.*, 2005).

En absence de NO, NorR est sous forme inactive. Il est lié à l'ADN par le domaine C-terminal sous forme de trimère (Justino *et al.*, 2005) mais les domaines N-terminal et central sont associés sous forme de complexe protéique. NorR se lie à l'ADN *via* les sites de fixation spécifiques qui consistent en 3 motifs GT-(N)₇-AC (Tucker *et al.*, 2004). Les 3 sites de fixation sont requis pour la formation de l'oligomère NorR-ADN et doivent être occupés pour l'activation de l'expression des gènes cibles (Tucker *et al.*, 2010a).

La liaison d'une unique molécule de NO sur le Fe^{2+} de la région N-terminale permet le changement de la conformation allostérique de la protéine. L'activité ATPase du domaine central est alors activée et permet l'interaction de NorR avec l'ARN polymérase contenant σ^{54} ainsi que le changement de la conformation de ce dernier (Bush *et al.*, 2010). L'ARN polymérase contenant σ^{54} peut alors se fixer sur ses promoteurs cibles afin d'activer leur expression. Chez la souche *E. coli* K-12 MG1655, l'étude de la délétion du gène *norR* a montré que seul l'opéron *norvW* est activé par NorR (Pullan *et al.*, 2007). L'opéron *norVW* code pour la flavorubédoxine. NorR réprime l'expression du gène *nrfA* codant pour la cytochrome *c* nitrite réductase (Pullan *et al.*, 2007). Ce résultat est surprenant puisque la cytochrome *c* nitrite reductase est impliquée dans la détoxification du NO, tout comme la flavorubédoxine, on s'attendrait par conséquent à une régulation identique de *norVW* et *nrfA*.

L'exposition des *E. coli* au NO ne modifie pas l'expression de *norR* mais l'activité de la protéine (Gardner *et al.*, 2003). Le résidu Fe²⁺ de NorR peut être oxydé par le peroxyde d'hydrogène ou du dioxygène. Cette oxydation empêche la fixation du NO et par conséquent l'activation des gènes cibles par NorR (Baptista *et al.*, 2012).

NsrR

NsrR (pour NO₂⁻-responsive repressor) a été identifié chez l'espèce bactérienne *Nitrosomonas europaea* (Beaumont *et al.*, 2004). Par la suite, le gène *yjeB* d'*E. coli* a été identifié par Bodenmiller et Spiro comme étant un homologue à *nsrR* (Bodenmiller & Spiro), on utilise donc désormais la terminologie NsrR pour ce senseur. On le retrouve chez de nombreuses espèces bactériennes. Sous sa forme non nitrosylée, NsrR est actif et agit généralement comme répresseur de la transcription des gènes cibles. NsrR se lie à l'ADN sur des motifs spécifiques à NsrR (**Figure 19**) (Partridge *et al.*, 2009; Rodionov *et al.*, 2005). Le site consensus de fixation de NsrR est composé de deux séquences palindromiques de 11pb séparées par n'importe quelle base. La liaison à l'ADN s'effectue par un motif hélice-tour-hélice (HTH) situé dans la région N-terminale de NsrR. NsrR agit en dimère où chaque monomère serait fixé sur une séquence de 11pb (Tucker *et al.*, 2008).



Figure 19 : Séquence consensus de fixation de NsrR. La séquence consensus de fixation de NsrR a été déterminée par l'alignement des régions promotrices des cibles connues de NsrR chez 17 bactéries (Tucker *et al.*, 2010b).

Concernant les gènes dont l'expression est réprimée par NsrR, le site consensus est généralement situé 10 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, c'est-à-dire dans la séquence du promoteur. Lorsque NsrR est fixé, l'ARN polymérase ne peut pas se lier à l'ADN et transcrire les gènes. En absence de NsrR, l'ARN polymérase peut se fixer sur le promoteur et les gènes sont alors exprimés. D'autre part, bien qu'étant généralement un répresseur, NsrR est également capable d'activer l'expression de certains gènes cibles (Filenko *et al.*, 2007), probablement en se fixant sur des séquences alternatives du site consensus, tout comme son homologue IscR. Certains gènes cibles ne possèdent qu'une moitié de la séquence consensus (11pb) (Partridge *et al.*, 2009). Il est proposé qu'un monomère se fixerait

spécifiquement sur cette moitié de séquence consensus alors que l'autre monomère se fixerait non-spécifiquement à l'ADN pour former le contact avec le premier monomère (Tucker *et al.*, 2010b). Une telle fixation non-spécifique a déjà été observée pour d'autres régulateurs tels que Crp, Arc et Gcn (Brown & Sauer, 1993 ; Hollenbeck & Oakley, 2000 ; Pyles *et al.*, 1998). D'autres gènes cibles possèdent plusieurs séquences consensus complètes, ce qui suggère qu'il existe un effet dose de la répression de la transcription des gènes par NsrR. Lorsque du NO pénètre dans la cellule bactérienne, ce dernier se fixe à NsrR par les centres [2Fe-2S] constitués par les Cystéines en position 91, 96 et 102 et un autre acide aminé qui serait une Histidine (Tucker *et al.*, 2010b). Cette fixation du NO sur les centres fer-soufre de NsrR supprime la liaison à l'ADN et permet la dé-répression des promoteurs et la transcription des gènes cibles (**Figure 20**).

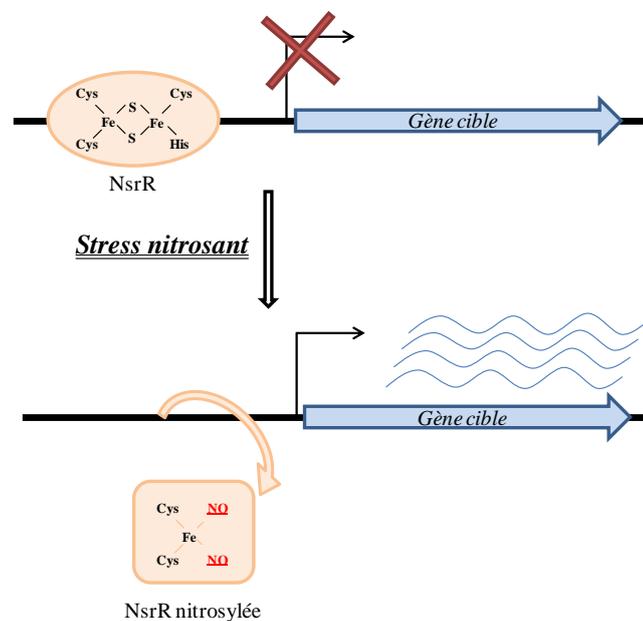


Figure 20 : Modèle de répression par NsrR. En absence de NO, NsrR est actif et est fixé sur les régions promotrices des gènes cibles pour réprimer leur expression. En présence de NO, le NO se fixe sur les centres [2Fe-2S] de NsrR ce qui empêche sa fixation à l'ADN. La répression des gènes cibles est levée et ces derniers sont alors exprimés (D'après (Tucker *et al.*, 2010b)).

Chez *E. coli*, NsrR régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la détoxification du NO, comme *hmp*, *nrfA*, *hcp* et *ytfE* par exemple (Filenko *et al.*, 2007)(**Tableau 4**). Les gènes *hmp* et *nrfA* codent respectivement pour une flavohémoglobine et la cytochrome *c* nitrite réductase, deux enzymes impliquées directement dans la détoxification du NO. Le rôle

physiologique de la protéine codée par *hcp* dans la réponse au stress nitrosant n'est pas clair (Almeida *et al.*, 2006; Cabello *et al.*, 2004 ; Wolfe *et al.*, 2002). Enfin, le gène *ytfE* coderait pour une protéine impliquée dans la réparation des clusters [Fe-S] endommagés par le NO (Justino *et al.*, 2007).

Liste des gènes réprimés par NsrR			Liste des gènes activés par NsrR		
Gènes	Fonction de la protéine	Opérons	Gènes	Fonction de la protéine	Opérons
<i>hcr</i>	NADH oxydoréductase	<i>hcp-hcr</i>	<i>insB1</i>	Inconnue	
<i>hcp</i>	NADH oxydoréductase		<i>insB2</i>	Inconnue	
<i>yccM</i>	Protéine membranaire avec [4Fe-4S]		<i>insB3</i>	Inconnue	
<i>uspF</i>	Protéine de liaison à l'ADN		<i>insB4</i>	Inconnue	
<i>yeaR</i>	Inconnue		<i>insB5</i>	Inconnue	
<i>ccmG</i>	Cytochrome <i>c</i>	<i>ccmABCDEFGH</i>	<i>insB6</i>	Inconnue	
<i>ccmF</i>	Cytochrome <i>c</i>		<i>ykf</i>	Inconnue	
<i>napB</i>	NO ₃ - réductase	<i>napFDAGHBC</i>	<i>mmuP</i>	Transporteur ABC	
<i>napH</i>	NO ₃ - réductase		<i>yafE</i>	Méthyl transférase	
<i>napD</i>	NO ₃ - réductase		<i>yagA</i>	Cytochrome <i>c</i>	
<i>napF</i>	NO ₃ - réductase		<i>dadA</i>	Déhydrogénase	
<i>hmpA</i>	Flavohémoglobine		<i>ykgF</i>	Déhydrogénase	
<i>ygbA</i>	Inconnue		<i>betB</i>	Bétaïne aldéhyde déhydrogénase	
<i>nrfA</i>	NO ₂ - réductase	<i>nrfABCDEFGH</i>	<i>cyoE</i>	Cytochrome <i>bo</i> oxydase	
<i>nrfB</i>	NO ₂ - réductase		<i>cyoC</i>	Cytochrome <i>bo</i> oxydase	<i>cyoABCDE</i>
<i>nrfC</i>	NO ₂ - réductase		<i>cyoB</i>	Cytochrome <i>bo</i> oxydase	
<i>nrfD</i>	NO ₂ - réductase		<i>cyoA</i>	Cytochrome <i>bo</i> oxydase	
<i>nrfE</i>	NO ₂ - réductase		<i>ompF</i>	Porine membranaire	
<i>nrfF</i>	NO ₂ - réductase		<i>ydbC</i>	Oxydoréductase	
<i>ytfE</i>	Protéine impliquée dans la réparation des centres fer-soufre		<i>ygeF</i>	Inconnue	
		<i>yiiL</i>	Rhamnose mutarotase		
		<i>yjbB</i>	Protéine en hélice α		
		<i>yjiV</i>	Inconnue		

Tableau 4 : Gènes dont l'expression est régulée par NsrR chez *E. coli* souche MG1655. Les cibles ont été identifiées grâce à l'expression en multicopies de la région promotrice de *ytfE*, qui monopolise les protéines NsrR disponibles dans la cellule, et non par mutation de *nsrR* (D'après (Filenko *et al.*, 2007)).

Des études transcriptomiques ont montré que l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus est activée en présence de NO, comme la réparation et l'assemblage des clusters [Fe-S], l'homéostasie du fer, ainsi que les systèmes de détoxification du NO dépendants de NorR et NsrR.

3.4.3. Dialogue moléculaire spécifique hôte-EHEC

Lors de la colonisation de l'intestin, les EHEC instaurent un dialogue moléculaire avec les cellules épithéliales. Ce dialogue moléculaire permet à l'hôte de se protéger face aux EHEC, et aux EHEC de prévenir la réponse de l'hôte.

Lors d'une infection à EHEC, du NO est produit par les cellules épithéliales en réponse à l'infection par la voie JAK-2/STAT-1. Les EHEC ont établi des stratégies pour contrer cette production de NO. D'une part ils inhibent la voie JAK-2/STAT-1 des entérocytes. Cette inhibition est due à l'augmentation de la production de l'hème oxygénase HO-1 par les cellules épithéliales. HO-1 empêche l'activation de STAT-1, qui ne peut plus alors activer l'expression de *nos-2*, malgré la présence de cytokines pro-inflammatoires. La iNOS n'est pas produite et par conséquent les entérocytes infectés par des EHEC ne produisent pas de NO (Vareille *et al.*, 2008). Le facteur bactérien responsable de cette inhibition de la voie JAK-2/STAT-1 n'a pas été identifié. D'autre part, les EHEC inhibent l'inflammation *via* la voie NF- κ B. Le facteur NF- κ B est un dimère qui peut être composé de différentes sous-unités en fonction des gènes cibles. Plusieurs études ont montré que certaines protéines bactériennes sécrétées dans la cellule épithéliale par le SSTT lors de l'adhésion des EHEC, telles NleH1, NleE et NleC, sont impliquées dans l'inhibition de la réponse inflammatoire *via* NF- κ B. NleH1 est une kinase qui se fixe sur la sous-unité RPS3 de NF- κ B. Cette fixation empêche la phosphorylation de RPS3, nécessaire à sa translocation dans le noyau cellulaire et par conséquent à son activité activatrice de l'expression des gènes cibles (Gao *et al.*, 2009 ; Wan *et al.*, 2011). Les sous-unités p50 et p65 sont également importantes dans la réponse inflammatoire NF- κ B. NleC est une protéase qui possède un domaine « en doigt de zinc » spécifique des protéases. Ce domaine permet le clivage de la sous-unité p65, qui empêche le complexe dimérique p50-p65 d'activer l'expression des gènes cibles (Yen *et al.*, 2010). Le rôle de NleE dans l'inhibition de la voie NF- κ B est indépendant de la voie d'inhibition par NleC, cependant le mode d'action de NleE n'a pas été identifié.

Il a été montré au laboratoire que le NO inhibe la production d'un des facteurs de virulence principaux des EHEC : la production de Stx. Le NO endogène (produit par les cellules

épithéliales) ou exogène (apporté par un donneur de NO dans le milieu), *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 la phase lytique du phage *stx* (**Figure 21**) (Vareille *et al.*, 2007).

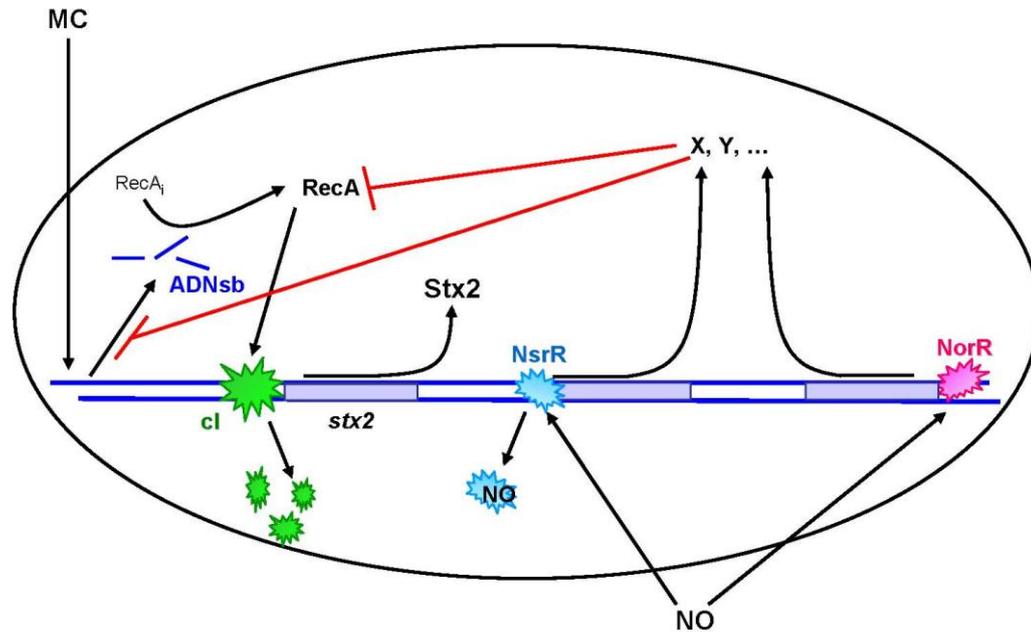


Figure 21: Modèle d'inhibition de la production de Stx par le NO (Vareille, 2008). MC : mitomycine C.

Donc le NO inhibe l'expression de *stx2*, et les EHEC inhibent la réponse immunitaire innée intestinale, y compris la production de NO. De l'issue de ce dialogue dépend en partie le devenir de l'infection.

4. Le di-GMP cyclique

4.1. Généralités

Les seconds messagers bactériens sont de petites molécules diffusibles qui transduisent des signaux environnementaux, permettant une adaptation physiologique des bactéries en réponse à différents stimuli.

Les seconds messagers bactériens permettent aux bactéries une réponse peu coûteuse en énergie et très rapide. En effet, la synthèse et la dégradation de seconds messagers bactériens mettent en jeu l'activité d'enzymes déjà présentes dans la cellule, ce qui utilise moins d'énergie que la synthèse *de novo* de composés complexes qui nécessite la transcription et la traduction des gènes. D'autre part, la synthèse et la dégradation des seconds messagers bactériens sont

beaucoup plus rapides que la synthèse de protéines (Tuckerman *et al.*, 2009). Les bactéries peuvent ainsi s'adapter et répondre rapidement à différentes conditions environnementales.

Le di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc) est une molécule cyclique composée de deux guanosine monophosphate dont la structure est présentée **Figure 22**. Il a été décrit pour la première fois chez *Gluconacetobacter xylinus* comme étant un activateur allostérique de la cellulose synthase (Ross *et al.*, 1987).

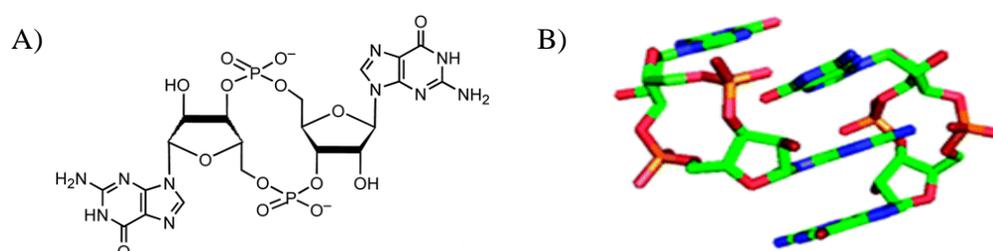


Figure 22 : Structure de la molécule di-guanosine monophosphate cyclique. A) structure 2D de la molécule di-GMPc, B) représentation tri-dimensionnelle de la molécule.

Généralement, la régulation de mécanismes cellulaires bactériens par un second messager met en jeu 4 composantes : les enzymes qui synthétisent et dégradent le second messager, une molécule effectrice sur laquelle le second messager se fixe, et les cibles de la molécule effectrice. C'est le cas par exemple pour l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc), qui est synthétisé par une unique adénylate cyclase et dégradé par une phosphodiesterase spécifique. La fixation de l'AMPc sur le facteur de transcription CRP permet un changement de conformation allostérique de ce dernier qui peut alors réguler les gènes cibles (Botsford & Harman, 1992). Concernant la régulation de mécanismes cellulaires bactériens par le di-GMPc, le principe est le même, avec une multiplicité des acteurs importante impliquant que le réseau de régulation du di-GMPc est plus complexe que celui de l'AMPc.

4.2. Le contrôle de la concentration intracellulaire en di-GMPc

4.2.1. Synthèse et dégradation du di-GMPc

Le di-GMPc est synthétisé par les diguanylates cyclases (DGC) à partir de deux molécules de GTP et est dégradé par les phosphodiesterases (PDE) en pGpG (**Figure 23**). Le pGpG est ensuite dégradé en 2 molécules de GMP. Le di-GMPc peut exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité des DGC.

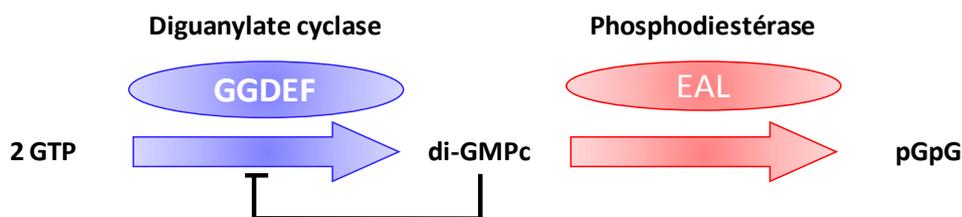


Figure 23: Métabolisme du di-GMPc. Le di-GMPc est synthétisé à partir de 2 GTP par les diguanylates cyclases qui possèdent un domaine GGDEF et dégradé en pGpG par les phosphodiésterases qui possèdent un domaine EAL. Le di-GMPc est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité DGC.

Les DGC et PDE nécessitent la présence de cofacteurs pour être actives. L'activité DGC nécessite la présence de l'ion Mg^{2+} , et l'activité PDE nécessite la présence d'ion Mg^{2+} ou Mn^{2+} . L'ion Ca^{2+} est quant à lui un inhibiteur de l'activité PDE (Hengge, 2009).

4.2.2. Structure des enzymes impliquées dans le métabolisme du di-GMPc

Domaine catalytique des DGC

Le domaine catalytique des DGC contient un motif GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe). Il a été décrit pour la première fois pour la protéine PleD, qui contrôle la mobilité de l'espèce bactérienne *Caulobacter crescentus* (Hecht & Newton, 1995). Une DGC active est un dimère du domaine GGDEF, avec un site actif (site A) situé à l'interface des deux domaines. Chaque domaine peut ainsi fixer une molécule de GTP afin de les transformer en une molécule de di-GMPc (**Figure 24**). Une mutation dans le site GGDEF empêche toute activité diguanylate cyclase, excepté une mutation de l'acide aspartique en acide glutamique. On a alors un domaine GGEEF. C'est le cas par exemple de la protéine WspR, une diguanylate cyclase de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. Cette protéine possède un domaine GGEEF fonctionnel capable de synthétiser du di-GMPc *in vivo* (Malone *et al.*, 2007). La plupart des DGC possèdent également un site RXXD capable de fixer le di-GMPc (site I). Ce site est séparé du site A par un site de liaison composé de 5 acides aminés. Lorsque le di-GMPc se fixe au site I, l'enzyme perd son activité diguanylate cyclase. Cela permet un rétrocontrôle négatif de l'activité diguanylate cyclase, empêchant ainsi que le système ne consomme trop de GTP et ne produise plus de di-GMPc que nécessaire. Une mutation de ce site entraîne un défaut de rétrocontrôle du di-GMPc sur l'activité diguanylate cyclase, conduisant à des phénotypes ectopiques, comme une mobilité bactérienne réduite par exemple (Christen *et al.*, 2006).

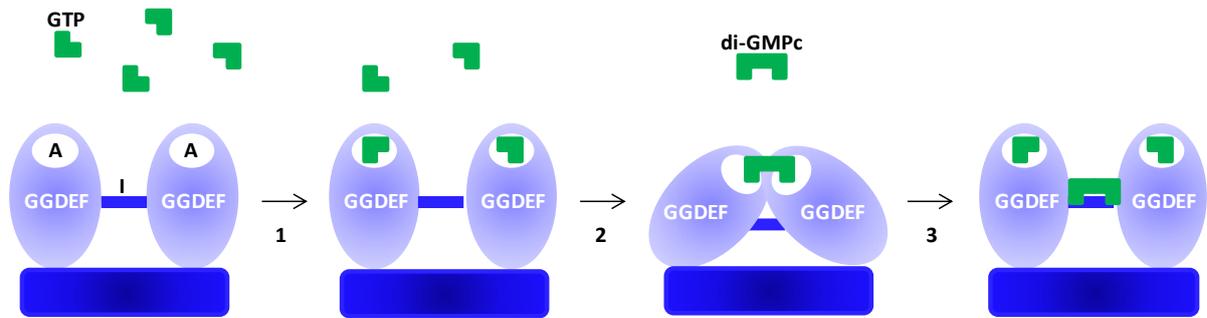


Figure 24: Représentation schématique de l'activité diguanylate cyclase des protéines à domaine GGDEF. Les diguanylates cyclases sont des dimères de domaines GGDEF, avec un site actif A et un site d'inhibition I. (1) Fixation de 2 molécules de GTP aux sites actifs des domaines. (2) La fixation des 2 GTP induit une activité enzymatique qui permet la synthèse du di-GMPc. (3) Une fois synthétisé, le di-GMPc peut se fixer au site d'inhibition de la protéine, empêchant une surproduction de di-GMPc.

Le domaine GGDEF est très conservé d'une DGC à l'autre au sein d'une même espèce bactérienne, ainsi qu'entre différentes espèces bactériennes. Cette conservation implique que l'on puisse généralement remplacer une DGC par une autre. C'est le cas par exemple de la DGC HsmT de l'espèce *Yersinia pestis* codée par le gène *hmsT*. Fonctionnellement, il est possible de compléter un mutant *hmsT* de *Yersinia pestis* par le gène *adrA* de *Salmonella enterica*, qui code pour une DGC orthologue de HsmT. Inversement, il est aussi possible de compléter un mutant *adrA* de *Salmonella enterica* par le gène *hmsT* de *Yersinia pestis* (Simm *et al.*, 2005). D'autre part, AdrA est une protéine orthologue de YaiC chez *E. coli* et est connue comme cette dernière. Il est important de noter que les DGC ne sont pas capables de réagir avec d'autres nucléotides que le di-GMPc.

Domaine catalytique des PDE

Le domaine catalytique des PDE contient un motif EAL (Glu-Ala-Leu) ou HD-GYP (His-Asp—Gly-Tyr-Pro), très conservés également d'une PDE à l'autre au sein d'une même espèce bactérienne mais également d'une espèce à une autre.

Le domaine catalytique EAL a été décrit pour la première fois pour la protéine BvgR, répresseur de l'expression de gènes impliqués dans la virulence de *Bordetella pertusis* (Merkel *et al.*, 1998). Une PDE active avec un domaine EAL est une enzyme monomérique qui dégrade le di-GMPc en pGpG. Certaines espèces bactériennes ne possèdent pas de protéines à domaine EAL, comme par exemple *Thermotoga maritima* (Galperin *et al.*, 1999).

Les PDE avec un domaine HD-GYP forment une sous-famille de la superfamille HD des phosphohydrolases metallo-dépendantes. Elles n'ont pas d'homologie avec les PDE à domaine EAL, et ne sont pas retrouvées chez toutes les espèces bactériennes (Galperin *et al.*, 1999). Les PDE à domaine HD-GYP sont à la fois capables de dégrader le di-GMPc en pGpG, mais également le pGpG en deux molécules de GMP, contrairement aux PDE à domaine EAL. Le domaine HD-GYP est retrouvé moins fréquemment que le domaine EAL (**Tableau 5**), et par conséquent est moins étudié. Nous parlerons donc par la suite des PDE à domaine EAL.

Les protéines à domaines GGDEF et EAL

Les DGC et les PDE possèdent respectivement un domaine GGDEF et un domaine EAL. Cependant, il existe des protéines qui possèdent à la fois un domaine GGDEF et un domaine EAL. Généralement, ces protéines possèdent soit une activité diguanylate cyclase, soit une activité phosphodiesterase, car un seul des deux domaines est actif. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le domaine inactif est capable de fixer le GTP (pour le domaine GGDEF) ou le di-GMPc (pour le domaine EAL). Cette fixation permet l'activité enzymatique de l'autre domaine conjugué. Chez l'espèce bactérienne *Caulobacter crescentus*, la phosphodiesterase PdeA possède un domaine GGDEF dégénéré (GEDEF) et un domaine EAL actif. Le GTP est capable de se fixer mais ne sera pas converti en di-GMPc. Cette fixation entraîne un changement de la conformation allostérique de la protéine, favorisant l'activité phosphodiesterase du domaine EAL associé (Christen *et al.*, 2005).

Cependant, certaines protéines qui possèdent un domaine GGDEF et un domaine EAL sont capables d'avoir une activité diguanylate cyclase ainsi qu'une activité phosphodiesterase. C'est le cas de la protéine MSDGC1 de *Mycobacterium smegmatis*, qui peut à la fois synthétiser et dégrader le di-GMPc *in vitro*. Chaque domaine isolé n'a cependant aucune activité dans le métabolisme du di-GMPc (Kumar & Chatterji, 2008). D'autres protéines qui possèdent les deux domaines GGDEF et EAL peuvent changer d'activité en fonction des conditions environnementales, comme le bactériophytochrome BphG1 de l'espèce *Rhodobacter sphaeroides*. *In vitro*, cette protéine a une activité diguanylate cyclase dépendante de la lumière, alors que son activité phosphodiesterase est indépendante de la lumière (Tarutina *et al.*, 2006). La protéine codée par le gène *dgc-1* de l'espèce *Gluconacetobacter xylinus* peut également changer d'activité en fonction des conditions de croissance (Bae *et al.*, 2004).

Environnement protéique

Mis à part les domaines actifs très conservés des DGC et des PDE, l'environnement en acides aminés de ces motifs est également très important pour la fonction catalytique. Le remplacement du domaine catalytique inactif de la PDE YcgF chez la souche d'*E. coli* K-12 MC4100 par le domaine actif d'une autre PDE montre que la protéine hybride n'est toujours pas active. Ceci indique qu'en plus du domaine EAL très conservé, les acides aminés présents dans l'environnement protéique sont importants pour la fonction catalytique de la PDE (Tschowri *et al.*, 2009).

Fréquence des DGC et PDE

Il existe chez la plupart des espèces bactériennes plusieurs gènes codant pour des protéines à domaine GGDEF et/ou EAL. En général, les bactéries à Gram négatif possèdent plus de protéines à domaine GGDEF et/ou EAL que les bactéries à Gram positif. Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, bactérie à Gram positif, on retrouve 4 protéines à domaine GGDEF et 3 protéines à domaine EAL. En revanche, *Vibrio vulnificus*, bactérie à Gram négatif, possède 66 protéines à domaine GGDEF et 33 protéines à domaine EAL. Chez la souche d'*E. coli* non pathogène MG1655, on retrouve 19 protéines à domaine GGDEF et 17 protéines à domaine EAL. Les protéines à domaine HD-GYP sont moins fréquentes que les protéines à domaine EAL, et on n'en retrouve aucune chez les espèces bactériennes *V. vulnificus*, *E. coli* et *Bacillus subtilis* par exemple (**Tableau 5**).

Espèce bactérienne	Nombre de domaines GGDEF	Nombre de domaines EAL	Nombre de domaines HD-GYP
<i>Vibrio vulnificus</i>	66	33	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	19	17	-
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	1	-
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3	-
<i>Mycobacterium</i>	1	2	-
<i>Synechocystis sp.</i>	23	13	2
<i>Borellia burgdorferi</i>	1	1	1
<i>Treponema pallidum</i>	1	-	3
<i>Aquifex aecolicus</i>	11	6	1
<i>Thermotoga maritima</i>	9	-	9

Tableau 5 : Nombre des protéines à domaine GGDEF, EAL et HD-GYP chez différentes espèces bactériennes. (D'après (Galperin *et al.*, 1999)).

La redondance des DGC et PDE est expliquée par la spécificité de chaque protéine. En effet, l'activité de chaque enzyme impliquée dans la synthèse et la dégradation du di-GMPc est dépendante de la phase de croissance mais également de la localisation cellulaire (Paul *et al.*,

2004). Il est connu que la délétion d'un gène codant pour une DGC ou une PDE peut modifier la physiologie de la bactérie, mais pas forcément la concentration globale intracellulaire en di-GMPc. Par exemple, chez *E. coli* K-12 souche BW25113, les protéines YeaI, YedQ et YfiN inhibent la mobilité bactérienne mais la délétion de chacun des gènes correspondant n'induit pas de modification de la concentration intracellulaire en di-GMPc (Sanchez-Torres *et al.*, 2011). D'autre part, l'activité enzymatique des DGC et PDE n'est pas régulée de la même façon d'une protéine à l'autre. En effet, les DGC et PDE possèdent des domaines N-terminaux très différents d'une protéine à une autre, ce qui suggère que de nombreux signaux environnementaux et cellulaires sont capables de moduler le métabolisme du di-GMPc. Il est important de noter qu'il y a, chez la plupart des espèces bactériennes, plus de protéines à domaine GGDEF que de protéines à domaine EAL. Le di-GMPc étant une molécule peu stable, on peut émettre l'hypothèse qu'il est plus important pour les bactéries de le synthétiser pour maintenir une concentration stable. En effet, lorsque les bactéries ne perçoivent pas de signaux qui nécessitent une diminution de la concentration en di-GMPc, ce dernier est probablement dégradé sans l'aide des PDE.

Aucun gène codant pour des protéines à domaine GGDEF et/ou EAL n'a été retrouvé chez les Archae et les Eucaryotes, ce qui suggère que le di-GMPc est une molécule fabriquée spécifiquement par les eubactéries (Galperin, 2004). Cependant, son implication dans des mécanismes cellulaires eucaryotes a été rapportée. Par exemple, le di-GMPc est capable d'agir comme un immunomodulateur en favorisant la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules eucaryotes (Karaolis *et al.*, 2007).

Les protéines à domaine GGDEF ou EAL dégénéré

Certaines protéines possèdent des domaines GGDEF et/ou EAL mais n'ont aucune activité dans le métabolisme du di-GMPc. Soit le domaine GGDEF et/ou EAL comporte un ou plusieurs acides aminés dégénérés par rapport à la séquence consensus qui permet de métaboliser le di-GMPc, soit certains acides aminés clés dans l'environnement du domaine GGDEF et/ou EAL ne sont pas conservés.

La plupart de ces protéines ont une autre activité biologique connue, et sont également impliquées dans la transduction de signaux environnementaux. On peut citer l'exemple de la protéine YcgF chez *E. coli* K-12 souche MC4100. YcgF possède un domaine EAL incapable de dégrader le di-GMPc (Tschowri *et al.*, 2009). Cependant, YcgF possède un autre domaine protéique, BLUF, qui capte la lumière bleue. En présence de lumière bleue, la conformation

allostérique de YcgF change et permet au domaine EAL de se fixer sur la protéine YcgE, empêchant cette dernière de réguler l'expression de ses gènes cibles (Suzuki *et al.*, 2006).

En conclusion, la multiplicité des protéines impliquées dans le métabolisme du di-GMPc montre que sa concentration doit être régulée finement. La régulation de la concentration en di-GMPc est contrôlée en amont, par la régulation de l'expression et/ou de l'activité des DGC et PDE.

4.2.3. Régulation de l'expression et/ou de l'activité des DGC et des PDE

La régulation du métabolisme du di-GMPc est un réseau complexe qui fait intervenir de nombreux régulateurs à différents niveaux.

Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Chez la plupart des espèces bactériennes, il existe plusieurs gènes codant pour des DGC et/ou PDE. Ces gènes peuvent être situés n'importe où dans le génome bactérien. Certains gènes codant pour des DGC et PDE sont transcrits en opérons. Chaque couple de DGC/PDE transcrit en opéron serait impliqué dans la régulation d'un même mécanisme cellulaire (Tuckerman *et al.*, 2009), comme le couple d'enzymes de *E. coli* DosC et DosP. Les deux gènes *dosC* et *dosP* codent respectivement pour une DGC et une PDE impliquées dans la réponse à la concentration en oxygène (Tuckerman *et al.*, 2009).

Le premier niveau de régulation a lieu sur le taux de transcription des différents gènes codant pour les protéines à domaine GGDEF et/ou EAL. Un des régulateurs principaux de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du di-GMPc est σ^S (RpoS). Ce dernier est un régulateur important lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance mais il répond également à de nombreux facteurs de stress environnementaux (Hengge-Aronis, 2002). σ^S régule l'expression d'au moins 15 gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme du di-GMPc lors de la transition vers la phase stationnaire (Sommerfeldt *et al.*, 2009 ; Weber *et al.*, 2006) (Tableau 6).

	Activés par σ^S	Réprimés par σ^S
Gènes codant pour des protéines à domaine GGDEF	<i>yaiC</i> , <i>ydaM</i> , <i>yddV</i> , <i>yedQ</i> , <i>yegE</i>	<i>ydeH</i>
Gènes codant pour des protéines à domaine EAL	<i>yciR</i> , <i>yddU</i> , <i>yjcC</i> , <i>ylaB</i> ,	<i>yfeA</i> , <i>rtn</i> , <i>ycgF</i> , <i>yjhH</i>

Tableau 6 : Récapitulatif des gènes impliqués dans le métabolisme du di-GMPc régulés lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance par σ^s . D'après les données de (Sommerfeldt *et al.*, 2009) et (Pesavento *et al.*, 2008).

D'autres régulateurs plus spécifiques influencent la transcription des gènes codant pour les protéines à domaine GGDEF et/ou EAL. Par exemple, le facteur σ spécifique des flagelles (σ^{FliA}) active l'expression du gène *yhjH*, codant pour une PDE fonctionnelle (Claret *et al.*, 2007; Pesavento *et al.*, 2008). YhjH est une PDE qui dégrade le di-GMPc et favorise en conséquence la mobilité bactérienne par l'intermédiaire de la mise en place du flagelle. L'activation transcriptionnelle de *yhjH* par le facteur σ^{FliA} permet d'établir un équilibre avec l'activation de l'expression des gènes *yegE* et *yedQ* par le facteur σ^s en fonction des conditions environnementales, puisque les facteurs σ^{FliA} et σ^s ne répondent pas aux mêmes signaux.

Des différences d'expression de gènes codant pour des DGC et/ou PDE ont été décrites en fonction de la température ou du milieu étudié. Cependant, le régulateur impliqué n'a pas été identifié (Sommerfeldt *et al.*, 2009).

Enfin, certaines protéines à domaine GGDEF et/ou EAL sont également régulatrices de l'expression d'autres gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du di-GMPc. C'est le cas de YdaM, protéine à domaine GGDEF, qui active l'expression de *yaiC* codant également pour une protéine à domaine GGDEF (Weber *et al.*, 2006).

En plus de cette régulation transcriptionnelle, certains ARNm de gènes codant des DGC ou PDE chez *E. coli* K-12 subissent des régulations post-transcriptionnelles par la protéine CsrA. CsrA déstabilise les ARNm des gènes suivants : *yddV* (GGDEF), *yliF* (GGDEF), *dos* (GGDEF-EAL), *yhjK* (GGDEF-EAL), *csrD* (GGDEF-EAL), *yliE* (EAL) et *yjcJ* (EAL). CsrA joue également un rôle minime dans la stabilité des ARNm codant pour les autres protéines à domaine GGDEF et/ou EAL (Jonas *et al.*, 2008).

La plupart des gènes codant des DGC ou PDE sont régulés par les mêmes facteurs de transcription. Afin de réguler finement la concentration en di-GMPc, il existe des régulations post-traductionnelles qui permettent d'agir sur la concentration et l'activité protéique.

Régulation post-traductionnelle

Une régulation post-traductionnelle plutôt que transcriptionnelle et post-transcriptionnelle met en jeu directement l'activité des protéines, ce qui permet une réponse rapide à des signaux environnementaux. Il existe plusieurs types de régulation post-traductionnelle des DGC et PDE.

L'activité DGC ou PDE peut être régulée par une protéolyse dépendant des conditions environnementales, comme par exemple la température. On peut citer par exemple la DGC

HmsT de *Yersinia pestis*, qui est dégradée spécifiquement par les protéases Lon et ClpPX à 37°C, mais pas à 26°C (Perry *et al.*, 2004). Une autre régulation post-traductionnelle qui s'exerce spécifiquement sur les DGC est la fixation du di-GMPc sur le site I de la protéine, qui inactive le site enzymatique des DGC. Cette inactivation est réversible par la présence de PDE qui dégradent le di-GMPc présent sur le site I, permettant sa libération (De *et al.*, 2008).

L'activité des DGC et PDE est également régulée en fonction des conditions environnementales. Ceci est permis par la présence d'un autre domaine protéique, généralement en N-terminal de la protéine. Il existe de nombreux domaines associés aux domaines GGDEF et EAL, cette diversité favorisant la complexité du réseau de régulation de la concentration en di-GMPc. Le domaine partenaire capte les signaux environnementaux ou cellulaires et régule en fonction l'activité DGC ou PDE de la protéine (Seshasayee *et al.*, 2010).

Il existe également une régulation spatiale des protéines à domaine GGDEF et EAL. Certaines protéines forment des « clusters » à des localisations spécifiques de la cellule bactérienne. On peut citer par exemple la protéine DGC WspR de l'espèce *P. aeruginosa* ou la protéine DGC PelD de l'espèce *C. crescentus*. Ces deux protéines fonctionnent de la même façon : dans certaines conditions environnementales, elles sont phosphorylées et actives (Guvener & Harwood, 2007 ; Paul *et al.*, 2004). Cette phosphorylation leur permet de former des « clusters » localisés où elles synthétisent du di-GMPc. De plus, de nombreuses protéines à domaine GGDEF et/ou EAL possèdent en N-terminal un peptide signal. Ce dernier permet la séquestration de la protéine dans des compartiments spécifiques de la bactérie, favorisant une régulation de la concentration en di-GMPc en fonction du micro environnement cellulaire.

Conclusion sur la régulation de l'expression et/ou l'activité des DGC et PDE

La multiplicité des protéines impliquées dans la régulation du di-GMPc nécessite une régulation fine de la synthèse et/ou l'activité de ces dernières, afin d'éviter des phénotypes ectopiques dus à des concentrations en di-GMPc inadaptées. La transcription des gènes codant pour des DGC et PDE n'est pas la cible majeure de la régulation de l'activité DGC et PDE. En effet, la plupart des gènes codant pour des DGC et PDE sont transcrits en phase stationnaire et présentent globalement les même taux d'expression les uns par rapport aux autres (Hengge, 2009). En revanche, les régulations post-traductionnelles sont majeures (Hengge, 2009) et permises notamment par la multiplicité des domaines couplés aux GGDEF et EAL. Ces domaines sont de différentes catégories, on retrouve par exemple des domaines partenaires qui captent des signaux afin de moduler l'activité DGC ou PDE, mais on retrouve également des

domaines signaux de localisation cellulaire, qui permettent quant à eux la séquestration des protéines. Cette séquestration permet de cibler plus précisément certains mécanismes cellulaires suite à une modulation de la concentration en di-GMPc dans le micro-environnement.

4.3.Rôle du di-GMPc chez les bactéries

4.3.1. Signaux transduits par le di-GMPc

Le di-GMPc est un transducteur de signaux environnementaux, et permet à la bactérie de répondre physiologiquement à ces signaux. La présence d'hélices transmembranaires associées aux domaines GGDEF et EAL permet au domaine sensoriel d'être situé dans le périplasme chez les bactéries à Gram négatif. Cette localisation permet aux domaines partenaires senseurs de capter les signaux environnementaux et de moduler en conséquence la concentration intracellulaire en di-GMPc. Il existe plusieurs domaines partenaires aux domaines GGDEF et EAL. Le domaine PAS est décrit comme un récepteur à l'oxygène. Le domaine GAS est assez proche du domaine PAS mais est plutôt impliqué dans la fixation d'autres ligands que l'oxygène, comme le GMPc par exemple, et serait responsable de certaines interactions protéine-protéine (Hurley, 2003; Taylor & Zhulin, 1999). Le domaine REC (ou Che-Y phosphoaccepteur) est quant à lui un domaine très conservé chez les bactéries. C'est un domaine protéique qui possède une histidine kinase permettant son autophosphorylation. Cette phosphorylation permet à ce domaine N-terminal de réguler l'activité du domaine associé en C-terminal (West & Stock, 2001). Le domaine REC est impliqué dans le chimiotactisme bactérien. Le domaine HAMP est aussi impliqué dans la régulation de l'activité enzymatique des DGC et PDE. Ce domaine permet de capter des signaux sensoriels et possède un domaine transmembranaire qui permet à la protéine de capter des signaux extracellulaires et en fonction de moduler l'activité du domaine GGDEF ou EAL associé (Kishii *et al.*, 2007). Il existe d'autres domaines associés à GGDEF et EAL : HDOD, un domaine hydrolase metallo-dépendant, et aussi le domaine BLUF, photorécepteur (Gomelsky & Klug, 2002). A ce jour, certaines DGC et PDE possèdent des domaines associés à GGDEF et EAL non annotés. La liste des domaines partenaires n'est donc pas exhaustive.

Cette diversité de domaines partenaires permet la transduction de nombreux signaux environnementaux et de moduler ainsi la concentration en di-GMPc. Les signaux environnementaux captés par les DGC et PDE sont par exemple : la présence d'ions, de phosphothréonine ou phosphotyrosine, d'acides aminés, de molécules gazeuses comme le NO, CO ou O₂, de carbohydrates, d'ADN, de nucléotides, le potentiel redox, la luminosité, la

présence de nutriments ainsi que la présence de nombreuses substances extracellulaires, comme les antibiotiques, les polyamines ou encore des molécules de dialogue intercellulaires (Romling *et al.*, 2005) (**Figure 25**).

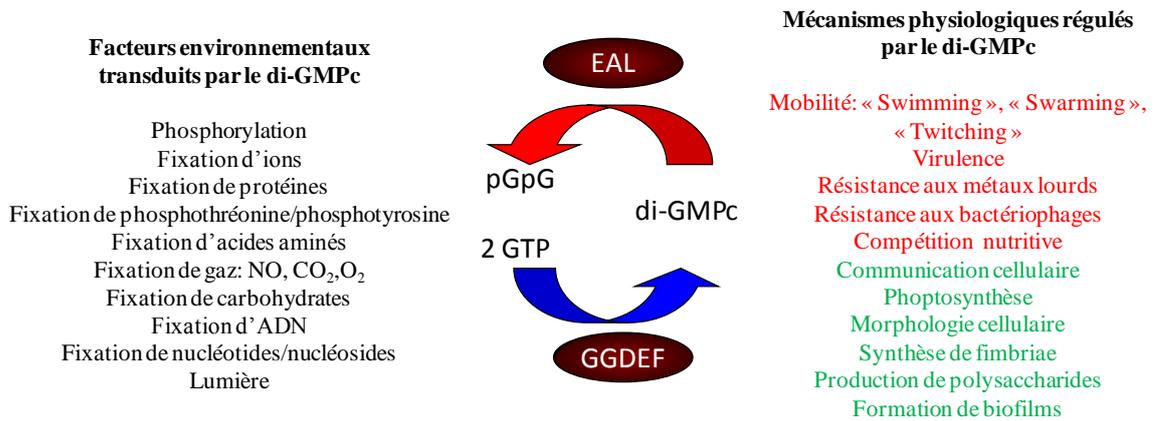


Figure 25 : Facteurs environnementaux transduits par le di-GMPc et mécanismes physiologiques régulés en conséquence. En rouge : mécanismes réprimés par le di-GMPc ; en vert : mécanismes activés par le di-GMPc.

4.3.2. Mécanismes d'action du di-GMPc/ cibles du di-GMPc

Le di-GMPc agit généralement sur l'activité protéique de sa cible, en changeant sa conformation allostérique. Il peut se fixer sur plusieurs types de molécules.

Tout d'abord, comme nous l'avons vu dans le chapitre « régulation post-traductionnelle », le di-GMPc est capable de se fixer sur les DGC fonctionnelles afin d'inhiber leur activité.

Ensuite, certaines protéines possèdent un ou plusieurs domaines fonctionnels ainsi qu'un domaine EAL dégénéré. La fixation du di-GMPc sur le domaine EAL dégénéré entraîne un changement de la conformation allostérique de la protéine, activant ou inhibant le ou les autre(s) domaines fonctionnels.

Le domaine de liaison du di-GMPc aux protéines cibles le plus connu est le domaine PilZ. Ce domaine a été décrit comme étant un récepteur au di-GMPc suite à des recherches *in silico*. Ce domaine porte le nom d'une protéine de *P. aeruginosa*, décrite comme récepteur au di-GMPc (Amikam & Galperin, 2006). Comme les protéines à domaine GGDEF et EAL, il existe plusieurs protéines à domaine PilZ au sein d'une même espèce bactérienne. On retrouve le domaine sous différentes conformations, seul, en tandem, ou encore associé à d'autres domaines tels que REC, HTH, GGDEF et EAL. Chez *E. coli*, il existe 2 protéines à domaine PilZ : la première protéine avec un tel domaine est la cellulose synthase. La deuxième est YcgR, impliquée dans la mobilité bactérienne. YcgR se lie spécifiquement au di-GMPc, et le domaine

PilZ seul est suffisant pour la fixation du di-GMPc (Ryjenkov *et al.*, 2006). Chez les autres bactéries, il existe d'autres protéines à domaine PilZ non retrouvées chez *E. coli*. Par exemple, le génome de *V. cholerae* code pour 5 protéines à domaine PilZ (Pratt *et al.*, 2007).

D'autres cibles du di-GMPc sont les riborégulateurs. Ces régulateurs sont des ARN non codants capable de moduler l'expression de certains gènes en fonction de la concentration en di-GMPc. Ils se fixent sur les ARNm afin de favoriser ou inhiber leur traduction. L'activité de certains riborégulateurs est favorisée en présence de di-GMPc alors que d'autres sont réprimés (Gu *et al.*, 2012). Par des recherches *in silico*, le motif GEMM, très conservé d'un riborégulateur à un autre, est retrouvé en amont de certains gènes codant des DGC et PDE, mais également en amont de gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes cellulaires régulés par le di-GMPc. Les analyses de ces riborégulateurs chez *V. cholerae* ont montré qu'ils sont impliqués dans la régulation par le di-GMPc de l'expression de gènes de virulence, codant pour la formation de fimbriae, ainsi que pour la biosynthèse de flagelles (Sudarsan *et al.*, 2008).

En conclusion, il existe de nombreuses cibles du di-GMPc au sein d'une espèce bactérienne. Ces cibles permettent au di-GMPc de réguler sa propre concentration, mais également de réguler la traduction de protéines, ou encore d'activer ou d'inhiber l'activité des protéines cibles afin de répondre physiologiquement aux signaux environnementaux transduits.

4.3.3. Processus cellulaires affectés par le di-GMPc

De nombreux processus cellulaires sont affectés par le di-GMPc. D'une façon générale, le di-GMPc permet à la bactérie de passer d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sédentaire lorsque la concentration intracellulaire en di-GMPc augmente (Simm *et al.*, 2004). En effet, le di-GMPc stimule la biosynthèse d'adhésines et des polysaccharides de surface synthétisés lors de la formation de biofilm. D'autre part, il inhibe la formation de flagelles impliqués dans la mobilité bactérienne.

La production de cellulose :

Le premier rôle du di-GMPc a été décrit pour la régulation de la production de cellulose. L'activation de la production de cellulose par le di-GMPc a été démontrée chez plusieurs espèces bactériennes étudiées (*G. xylinus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, etc). Le di-GMPc est un activateur allostérique de la cellulose synthase, favorisant ainsi la production de cellulose (Ross *et al.*, 1987). Le rôle des protéines à domaine GGDEF dans la production de cellulose est universel, car il est possible de remplacer une DGC par une autre DGC orthologue pour activer la production de cellulose. En effet, lorsque la protéine YcdT d'*E. coli* est surexprimée chez *S. Typhimurium*,

on observe une augmentation de la concentration en di-GMPc, corrélée à une augmentation de la production de cellulose (Simm *et al.*, 2004). Cependant, le mécanisme d'action du di-GMPc sur la production de cellulose doit être étudié plus en détail. Les seules études effectuées ont montré que le di-GMPc se fixe à BcsB, BcsB et BcsA formant le corps du complexe de la cellulose synthase chez tous les procaryotes qui possèdent une cellulose synthase (Mayer *et al.*, 1991).

La mobilité bactérienne :

La mobilité bactérienne dépend de la production de différents appendices de la surface bactérienne : les flagelles et les fimbriae. Le di-GMPc est impliqué dans la mise en place des différents types d'appendices, ce qui lui permet de réguler la mobilité bactérienne. Il existe 3 types de mobilité bactérienne : « swimming », « swarming » et « twitching ». La mobilité de type « swimming » est un déplacement sur une surface permis par la présence de flagelles fonctionnels. La mobilité de type « swarming » est un déplacement au travers d'un milieu plutôt solide permis par la présence de flagelles fonctionnels chez certaines bactéries. En revanche, la mobilité de type « twitching » au travers d'un milieu solide est indépendant des flagelles et met plutôt en jeu les fimbriae (Merz *et al.*, 2000).

Les flagelles sont des organelles complexes dont la synthèse dépend de nombreux produits de gènes. Les flagelles bactériens sont produits de façon séquentielle. Chez *E. coli*, le régulateur principal de classe I FlhD₂C₂ régule la transcription des gènes de classe II, codant pour les composants de l'appareil externe, le corps basal et le crochet. Les gènes de classe II codent également pour FliA, le facteur sigma spécifique des flagelles, qui régule quant à lui l'expression des gènes de classe III, codant pour les protéines impliquées dans les composants associés au flagelle à assembler en dernier lieu, comme les protéines associées au crochet, la flagelline, les protéines motrices ainsi que celles impliquées dans le chimiotactisme (Pruss, 2000). FliZ est également une protéine codée par les opérons du système flagellaire, mais n'est pas requis pour la mobilité.

Chez *E. coli*, FliA, en plus de son rôle dans l'expression des gènes de classe III, active l'expression de *yhjH*, codant pour une PDE. De plus, FliZ, en inhibant l'activité du facteur σ^S , inhibe l'expression des gènes codant pour les DGC YegE, YeaJ et YedQ. YegE, YeaJ, YedQ et YhjH sont des protéines impliquées toutes les 4 dans le même mécanisme de mobilité. En fait, l'activation de l'expression de *yhjH* et l'inhibition de l'expression de *yegE*, *yeaJ* et *yedQ*, conduisent à une diminution de la concentration en di-GMPc. Le di-GMPc ne se fixe plus sur la protéine YcgR, la mise en place du flagelle est alors favorisée (**Figure 26**) (Pesavento *et al.*,

2008). En fait, YcgR possède un domaine PilZ en N-terminal. La fixation du di-GMPc sur ce dernier favorise l'interaction entre YcgR et la sous-unité FliG du flagelle. Cette interaction empêche la fonction correcte du moteur flagellaire, ce qui diminue la mobilité bactérienne (Fang & Gomelsky, 2010). D'autre part, la régulation de l'activité YhjH par le facteur σ^{FliA} (Claret *et al.*, 2007) et de YegE par le facteur σ^{S} permettent de contrôler l'expression de *csgD*, impliqué dans la production de fimbriae. En effet, YhjH inhibe la production de fimbriae en réprimant l'expression de *csgD*, alors que YegE l'active (Figure 26) (Pesavento *et al.*, 2008). De manière générale, YhjH est plutôt exprimé en phase exponentielle de croissance alors que YegE est plutôt exprimé en phase stationnaire. Durant la croissance bactérienne, il y aurait donc un point de contrôle précis de la concentration en di-GMPc à partir duquel la bactérie stoppe la formation de flagelle et active la production de curli.

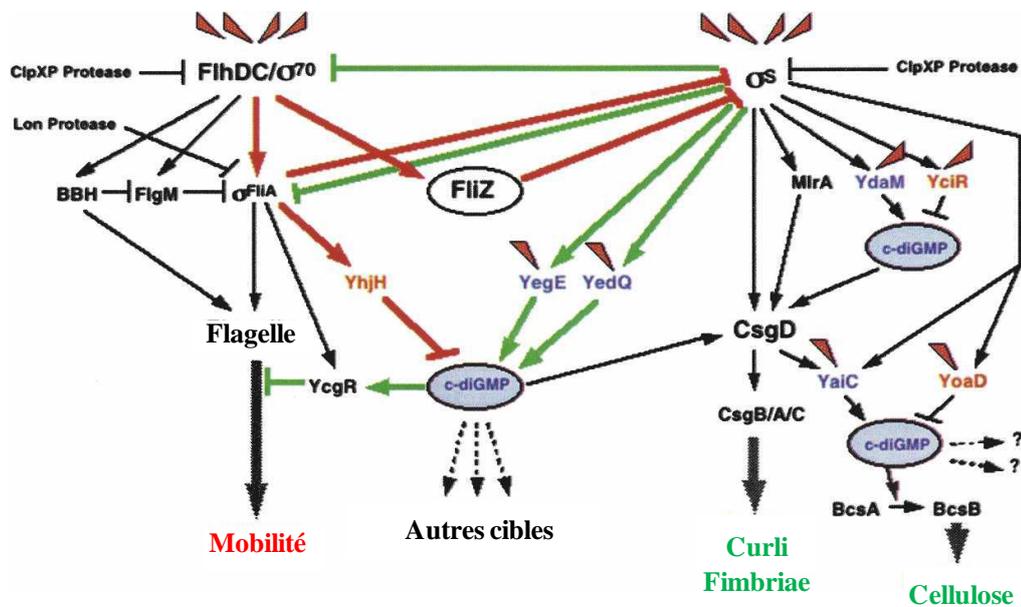


Figure 26 : Régulation de la mobilité et de la formation de biofilm chez *E. coli* K-12 (Pesavento *et al.*, 2008).

Chez *P. aeruginosa*, la mobilité de type « twitching » implique la protéine FimX, qui contient plusieurs domaines protéiques : REC, PAS, EAL et GGDEF. Dans un mutant délété pour le gène *fimX*, la production des différentes sous-unités codant pour les fimbriae de type IV reste identique, mais on observe moins de fimbriae à la surface des mutants comparativement à la souche sauvage. FimX est une PDE, et la mutation du domaine EAL entraîne une augmentation de la concentration en di-GMPc et une altération de la mobilité de type « twitching ». Il est important de noter que le domaine GGDEF est nécessaire à l'activité PDE de

FimX. Ainsi, le di-GMPc joue un rôle essentiel dans la mise en place des fimbriae de type IV chez *P. aeruginosa*, impliqués dans la mobilité de type « twitching » (Huang *et al.*, 2003).

La formation de biofilm :

Un autre mécanisme important régulé par le di-GMPc est la formation de biofilm. Un biofilm est défini comme une communauté bactérienne sessile caractérisée par l'adhésion à une surface solide et par la production d'une matrice qui entoure les bactéries. Cette matrice est composée de polysaccharides extracellulaires, de protéines et également d'ADN. La régulation de la formation de biofilm est complexe et fait intervenir différents signaux. On peut citer par exemple : i) les signaux mécaniques, comme une déficience en production flagellaire induisant la production de biofilms, ii) les signaux nutritionnels, avec par exemple le glucose comme inducteur de la formation de biofilm, iii) les signaux transduits par des molécules inorganiques comme le fer, iv) l'osmolarité, v) les signaux dérivés de l'hôte, vi) les molécules antimicrobiennes, vii) les signaux du quorum sensing (Karatan & Watnick, 2009). Ces signaux induisent une réponse bactérienne qui fait intervenir, parmi d'autres molécules, le di-GMPc.

Le di-GMPc est un activateur de la formation de biofilm chez les espèces bactériennes étudiées jusqu'à présent. En effet, chez *V. cholerae*, une augmentation de la concentration en di-GMPc favorise l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes de la région *vps*, dont l'expression est nécessaire à la formation correcte d'un biofilm. On retrouve également les gènes *eps*, codant pour un système de sécrétion de type II connu pour être couplé à la formation de biofilm, et les gènes *msh*, impliqués dans la formation de fimbriae de type IV de *V. cholerae* nécessaires à l'adhésion de ce dernier aux surfaces biotiques et abiotiques (Beyhan *et al.*, 2006).

Chez *P. aeruginosa*, l'implication du di-GMPc dans la formation de biofilm a également été beaucoup étudiée. Ainsi, on sait que WspR est une protéine impliquée dans la formation de biofilm par la synthèse de di-GMPc. En effet, WspR possède un domaine GGDEF ainsi qu'un autre domaine pouvant être phosphorylé. La phosphorylation de WspR permet l'activité DGC de cette dernière, favorisant ainsi la synthèse de di-GMPc. La concentration en di-GMPc issue de cette activité DGC est directement impliquée dans la formation de biofilm, par l'activation de l'expression des gènes des opérons *pel* et *psl*, impliqués dans la production d'exopolysaccharide et d'autres protéines impliquées dans la formation de biofilm. Il est important de noter que la protéine WspF régule l'activité DGC de WspR, probablement en modulant sa phosphorylation. Cela empêche une activité DGC constitutive de WspR, et donc une formation de biofilm

inadaptée (Hickman *et al.*, 2005). D'autres protéines impliquées dans le métabolisme du di-GMPc régulent la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. C'est le cas de SadC, une DGC, et BifA, une PDE. Lorsque *sadC* est surexprimé, on observe une augmentation de la formation de biofilm ainsi qu'une plus forte production d'exopolysaccharide, due à une augmentation de la production de di-GMPc. Cette activation de la formation de biofilm est dépendante des gènes *pelA* et *pelG*, impliqués dans la production de l'exopolysaccharide. Cependant, l'expression de *pelA* et *pelG* n'est pas activée lorsque SadC est surexprimé, montrant que la régulation exercée par le di-GMPc s'effectue au niveau post-transcriptionnel (Merritt *et al.*, 2007). De la même façon, BifA est une phosphodiesterase dont la délétion entraîne une augmentation de la formation de biofilm (Kuchma *et al.*, 2007). SadC et BifA possèdent un domaine transmembranaire et co-localisent au niveau de la membrane interne, avec une activité cytoplasmique sur la concentration en di-GMPc. L'hypothèse sur l'activité des DGC et PDE impliquées dans un même mécanisme physiologique suggère que BifA et SadC soient deux protéines qui agissent en synergie dans la formation de biofilm, en modulant la concentration en di-GMPc.

La production de l'exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) :

La production de PNAG est souvent reliée à la formation de biofilm chez les bactéries. En effet, le PNAG est une adhésine de surface qui est mise en place lors de la formation de biofilm. Chez *E. coli*, les protéines nécessaires à la mise en place de PNAG sont codées par l'opéron *pgaABCD* (Wang *et al.*, 2004). La DGC YdeH inhibe la synthèse protéique de PgaD de façon post-transcriptionnelle. PgaD est une protéine membranaire nécessaire à la formation de PNAG. (Boehm *et al.*, 2009). Il est important de noter que *ydeH* est une des DGC régulée par CsrA, codant également pour le régulateur principal de l'opéron *pgaABCD*.

D'autre part, *yddV* est un gène codant pour une DGC chez *E. coli*. YddV active l'expression de l'opéron *pgaABCD* lorsque *yddV* est surexprimé dans la souche d'*E. coli* K-12 MG1655, ce qui conduit à une adhésion plus importante (Tagliabue *et al.*, 2010). D'autre part, *yddV* est transcrit en opéron avec le gène *dos*, codant pour une PDE (Mendez-Ortiz *et al.*, 2006). *yddV* et *dos* (correspondant aux gènes *dosC* et *dosP* du chapitre « organisation génomique ») codent pour deux protéines capables de former un complexe stable (Tuckerman *et al.*, 2009). Ce complexe permet de moduler la synthèse et la dégradation du di-GMPc en fonction des conditions environnementales (oxygène). L'analyse de la régulation de l'opéron *pgaABCD* par Dos a

montré que, à l'inverse de *yddV*, Dos réprime l'expression de *pgaABCD* (Tagliabue *et al.*, 2010). Cette régulation de l'opéron *pga* par YddV et Dos est indépendante de CsrA.

Conclusion sur les différents processus affectés par le di-GMPc

Le di-GMPc est un acteur clé dans la régulation de la mobilité chez différentes espèces bactériennes. En effet, chez la plupart des espèces bactériennes où il a été étudié, certaines protéines impliquées dans la mobilité bactérienne peuvent fixer le di-GMPc ou en moduler sa concentration. Cela permet le contrôle de la mise en place des différents appendices bactériens mis en jeu dans la mobilité. D'autre part, chez de nombreuses espèces bactériennes, le di-GMPc est un régulateur important de la formation de biofilm, d'une part parce qu'il est répresseur de la mobilité bactérienne, qui est associée au mode de vie planctonique, mais aussi en activant la production de matrice extracellulaire ainsi que d'autres protéines impliquées dans l'architecture des biofilms. Enfin, d'autres processus cellulaires sont régulés par le di-GMPc et tous n'ont pas été cités précédemment (**Figure 25**).

4.3.4. Le di-GMPc et les mécanismes de virulence

Le rôle du di-GMPc a clairement été démontré dans la virulence de certaines bactéries pathogènes. Les études effectuées jusqu'à présent montrent que c'est l'activité PDE qui est impliquée dans la virulence des bactéries pathogènes. Les PDE dégradent le di-GMPc, et la diminution de la concentration en di-GMPc favorise la virulence.

Tout d'abord, certaines PDE sont les senseurs d'un système à deux composants, et induisent l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la virulence bactérienne. C'est le cas par exemple de la PDE VieA chez *V. cholerae*. VieA est le régulateur du système à deux composants VieSA, et est requise pour l'expression de *toxT* codant le régulateur transcriptionnel majeur des gènes impliqués dans la colonisation de *V. cholerae* et du gène codant pour la toxine cholérique (Tischler & Camilli, 2005).

Aussi, des PDE ont été décrites comme importantes dans la colonisation d'un modèle murin pour plusieurs espèces de bactéries pathogènes. C'est le cas par exemple de la PDE HmsP de *Y. pestis*, qui favorise l'apparition précoce des symptômes dans un modèle murin (Bobrov *et al.*, 2011). Il est important de noter que HmsP est la seule PDE active chez *Y. pestis*, suggérant le rôle important du di-GMPc dans la virulence de l'espèce bactérienne. La PDE CdgR de *S. Typhimurium* est également impliquée dans la virulence bactérienne, notamment en favorisant la réponse au stress oxydant de la bactérie qui est plus résistante par conséquent à la réponse immune de l'hôte (Hisert *et al.*, 2005). Enfin, la PDE PvrR de *P. aeruginosa* est nécessaire à la

virulence dans un modèle murin, puisque sa délétion entraîne une avirulence totale (Kulasakara *et al.*, 2006).

En conclusion, le di-GMPc est un inhibiteur de la virulence chez les différentes espèces bactériennes étudiées jusqu'alors. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de la virulence par le di-GMPc ne sont pas clairement définis et le rôle du di-GMPc chez d'autres espèces bactériennes pathogènes reste à être déterminé.

4.3.5. Le di-GMPc chez les *E. coli* K-12

Le rôle du di-GMPc chez *E. coli* n'a été étudié jusqu'à présent que chez des souches d'*E. coli* K-12 ainsi que chez une souche d'*E. coli* adhérent et invasif (AIEC), associée à la maladie de Crohn. Chez *E. coli* K-12, il existe 29 protéines à domaines GGDEF et/ou EAL dont 7 qui possèdent les 2 domaines (Tableau 7).

Protéine	Activité	Implication dans la physiologie bactérienne	Gènes ou mécanismes régulés
YdaM	DGC	Mobilité	Opéron <i>csgDEF</i>
YciR	PDE	Mobilité	Opéron <i>csgDEF</i>
YhjH	PDE	Mobilité	Opéron <i>csgDEF</i> Mise en place du flagelle
YegE	PDE	Mobilité	Opéron <i>csgDEF</i> Mise en place du flagelle
YdeH	DGC	Mobilité	Formation des pili Mise en place du flagelle
YcdT	DGC	Mobilité	Inconnus
YddV	DGC	Formation de biofilm	Opéron <i>pgaABCD</i> (PNAG) Opéron <i>csgBAC</i> (Fimbriae)
Dos	PDE	Formation de biofilm	Opéron <i>pgaABCD</i> (PNAG) Opéron <i>csgBAC</i> (Fimbriae)
YeaP	DGC		Opéron <i>csgBAC</i> (Fimbriae)
YeaI	DGC	Mobilité Formation de biofilm	Inconnus
YedQ	DGC	Mobilité Formation de biofilm	Inconnus
YfiN	DGC	Mobilité Formation de biofilm	Inconnus

Tableau 7 : Liste des protéines DGC ou PDE chez *E. coli* dont l'activité et le rôle dans la physiologie bactérienne a été décrit. En rouge : mécanismes ou gènes réprimés par l'activité protéique ; en vert : mécanismes ou gènes activés par l'activité protéique.

Le **Tableau 7** montre que les différentes DGC et PDE étudiées à ce jour chez *E. coli* K-12 sont impliquées dans la mobilité bactérienne et/ou dans la formation de biofilm. Généralement, les DGC qui répriment la mobilité activent l'expression de l'opéron *csgBAC* ou *csgDEF*. L'opéron *csgBAC* code pour les protéines CsgA et CsgB, qui forment les fimbriae d'adhésion (La Ragione & Woodward, 2002). L'opéron *csgDEF* code pour CsgD, l'activateur principal de l'opéron *csgBAC* (Hammar *et al.*, 1996). Les PDE qui activent la mobilité bactérienne répriment généralement l'expression des opérons *csgBAC* ou *csgDEF*. Les DGC et PDE qui influencent la formation de biofilm régulent la production du PNAG. Notons le cas particulier des DGC YegE et YdeH et de la PDE YhjH qui inhibent et favorisent la mobilité bactérienne respectivement en régulant la mise en place du flagelle. YdeH inhibe également la formation des pili. La multiplicité des protéines régulant les mêmes mécanismes est due à la nécessité pour la bactérie de répondre physiologiquement à divers signaux environnementaux, toutes les protéines n'étant pas synthétisée ou actives dans les mêmes conditions de croissance et/ou environnementales.

La première régulation de l'expression des différents gènes codant les DGC ou PDE intervient en fonction de la phase de croissance. En effet, la plupart des gènes codant les DGC et PDE sont exprimés préférentiellement lors de la phase stationnaire de croissance. Cependant, les gènes *yeaJ* et *yhjH*, codant respectivement pour une protéine à domaine GGDEF et une PDE, sont transcrits préférentiellement en phase exponentielle de croissance (Sommerfeldt *et al.*, 2009). L'activité et le rôle de la protéine YeaJ n'ont pas été décrits mais elle pourrait jouer un rôle dans la mobilité bactérienne en activant l'expression de l'opéron *csgDEF* et en réprimant la mise en place du flagelle. La régulation de l'expression de certains gènes codant les DGC et PDE est également fonction de la température puisque 8 gènes présentent une expression différente en fonction de la température. Sept gènes sont préférentiellement exprimés à 28°C, alors que le gène *yeaJ* est quant à lui plus exprimé à 37°C (Sommerfeldt *et al.*, 2009). La mobilité des *E. coli* est plus importante à 37°C qu'à 28°C. L'expression plus importante du gène *yeaJ* à 37°C est un argument supplémentaire pour une activité DGC de YeaJ couplée à celle de la PDE YhjH dans la mise en place du flagelle. L'expression du gène *yhjH* est régulée par le facteur σ^{FliA} spécifique des flagelles (Claret *et al.*, 2007). La régulation de l'expression de *yeaJ* n'a quant à elle pas été étudiée. L'activité DGC de la protéine YegE est impliquée dans les mêmes mécanismes de régulation que YhjH. Cependant la régulation transcriptionnelle de *yegE* est dépendante du

facteur σ^s , contrairement à celle de *yhiH* (Pesavento *et al.*, 2008). Cependant, les différents mécanismes régulés par YegE et YhjH suggèrent que le di-GMPc métabolisé par ces deux protéines est largement diffusible dans la cellule.

Une seconde régulation exercée sur la production des protéines impliquées dans le métabolisme du di-GMPc est une régulation post-transcriptionnelle sur la stabilité des ARNm transcrits. En particulier, les ARNm de *ycdT*, *ydeH*, *yddV* et *dos* sont déstabilisés par la protéine CsrA en phase stationnaire de croissance (Jonas *et al.*, 2008). YdeH est une DGC dont l'activité réprime la mobilité en inhibant la mise en place flagellaire ainsi que la formation des pili, notamment lors d'un stress ribosomal (Boehm *et al.*, 2009 ; Jonas *et al.*, 2008). YdeH favorise également la formation des biofilms en activant l'expression de *pgaD*, codant pour une protéine membranaire indispensable à la formation du PNAG (Boehm *et al.*, 2009). Les gènes *yddV* et *dos* sont transcrits en opéron et codent respectivement pour une DGC et une PDE (Tuckerman *et al.*, 2009). Les protéines forment des dimères YddV-Dos, et possèdent un noyau hème. Ce dernier fixe l'oxygène et permet d'orienter l'activité DGC ou PDE du complexe en fonction de la concentration en oxygène. L'activité de ce complexe régule la production du PNAG *via* l'expression de l'opéron *pgaABCD* (Tagliabue *et al.*, 2010). La protéine YcdT est une DGC avec un domaine transmembranaire. Son activité inhibe la mobilité des *E. coli* K-12 (Jonas *et al.*, 2008), cependant les mécanismes n'ont pas encore été étudiés. Le promoteur de *ycdT* est juxtaposé au promoteur de l'opéron *pgaABCD*. Les gènes codant les régulateurs sont souvent situés à proximité des gènes cibles, suggérant que YcdT inhibe la mobilité en favorisant la production de biofilms *via* l'activation de l'expression de l'opéron *pgaABCD*.

Mendez-Ortiz *et al.* ont étudié l'impact global du di-GMPc chez *E. coli* K-12, en augmentant artificiellement la concentration en di-GMPc par la surexpression du gène *yddV* codant pour une DGC active (Mendez-Ortiz *et al.*, 2006). L'étude a montré que le di-GMPc inhibe la division cellulaire. De plus, l'analyse transcriptomique effectuée a permis de mettre en évidence la diversité des gènes dont l'expression est altérée par le di-GMPc. On retrouve des gènes codant des protéines impliquées dans la modification de la paroi cellulaire, dans le métabolisme du fer, dans la réponse superoxide, dans le métabolisme du sucre, dans la division cellulaire, dans la mobilité bactérienne. On observe également une répression de l'expression des gènes régulateurs *gadE* et *gadX* en présence de di-GMPc (**Tableau 8**).

Rôle des protéines codées par les gènes régulés	Gènes correspondant dont l'expression est <i>activée</i> par le di-GMPc	Rôle des protéines codées par les gènes régulés	Gènes correspondant dont l'expression est <i>réprimée</i> par le di-GMPc
Protéines impliquées dans la modification de la paroi cellulaire	<i>rcaA, acrA, b2056 (wcaD), nlpA</i>	Protéines du régulon de Fur	<i>gltA, sufA, sufB, sufS</i>
Protéines impliquées dans le métabolisme du fer	<i>fur</i>	Protéines impliquées dans le métabolisme du sucre	<i>aceA, gltA, citF, yeiC, sdhA, agaD, b2387, ygbL</i>
Protéines impliquées dans la réponse superoxyde	<i>soxS</i>	Protéines associées à des perméases	<i>uhpC, b1688, b1966, b1683, bcr, yjiJ, oppB, yfcA</i>
Régulateurs transcriptionnels	<i>ynfL, nadR, xapR, zraR</i>	Protéines associées à la membrane	<i>ymgE, b2430, yhjU, yjba, glpG, b1966, yqhA, b2433, ycdP,</i>
Protéines impliquées dans la division cellulaire	<i>b1570 (ftsT), b3462 (ftsX)</i>	Régulateurs transcriptionnels	<i>gadE, gadX, yfhH, yneA, ygb1, ydeW, yieP</i>
		Protéines impliquées dans la mobilité	<i>yfcP, hofF</i>

Tableau 8 : Protéines dont la transcription du gène est altérée par une augmentation de la concentration en di-GMPc (D'après les données de (Mendez-Ortiz *et al.*, 2006)).

En conclusion, chez *E. coli*, beaucoup d'analyses ont été effectuées récemment sur les mécanismes qui mettent en jeu le di-GMPc. Le di-GMPc est impliqué dans la mobilité et dans la formation de biofilm comme chez les autres bactéries pour lesquelles le di-GMPc a été étudié. La complexité du réseau de régulation du di-GMPc implique que de nombreuses cibles et mécanismes moléculaires régulés par le di-GMPc sont non connus à ce jour. D'autre part, le rôle du di-GMPc dans la virulence des différents pathovars d'*E. coli* n'a encore jamais été étudié, et il serait intéressant de déterminer si le di-GMPc chez les EHEC est un inhibiteur de la virulence des *E. coli* pathogènes.

4.4. Dialogue moléculaire hôte-pathogène *via* le NO et le di-GMPc

Du côté du pathogène, le di-GMPc est un second messager bactérien. Il a été clairement démontré qu'il diminue la virulence de nombreuses espèces bactériennes, notamment en réprimant l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulence. Du côté de l'hôte, lors de l'inflammation le NO est produit comme une défense contre les infections par certains types cellulaires et notamment par les cellules épithéliales. Chez certaines bactéries pathogènes, comme *Legionella pneumophila* et *Pseudomonas aeruginosa*, la présence de NO à faible concentration favorise la dégradation du di-GMPc. Cela a pour conséquence la diminution de la formation de biofilm et par conséquent la dispersion des pathogènes est favorisée (Barraud *et al.*, 2009 ; Carlson *et al.*, 2010). Le NO agit *via* des intermédiaires spécifiques qui le fixent et contrôle l'expression des gènes codant les DGC et PDE (Barraud *et al.*, 2009 ; Carlson *et al.*,

2010). La présence de NO en faible concentration ne serait donc pas protectrice vis-à-vis des agents pathogènes, et favoriserait au contraire leur virulence. Ces résultats suggèrent que certains pathogènes se seraient adaptés à l'hôte, et que la production de NO par l'hôte serait un facteur environnemental capté par la bactérie pathogène pour en favoriser sa virulence.

Si le NO en faible concentration favorise la dégradation du di-GMPc chez les bactéries pathogènes, le di-GMPc module lui aussi la production de NO par l'hôte. En effet, le di-GMPc est un immunostimulateur, et le traitement de souris avec du di-GMPc synthétisé chimiquement leur permet de mieux résister à une infection par *Klebsiella pneumoniae* (Karaolis *et al.*, 2007). Le di-GMPc injecté induit l'expression de certaines protéines impliquées dans la réponse immune comme les cytokines MIP-2, IL-12 et IFN γ , et active l'expression de la iNOS par les cellules pulmonaires des souris. En présence de di-GMPc, on observe donc une augmentation de la production de NO. Le di-GMPc, connu pour inhiber la virulence des bactéries serait donc un activateur de la réponse immune innée.

Le dialogue moléculaire hôte-pathogène *via* le NO et le di-GMPc induit ou non la virulence du pathogène (**Figure 27**) :

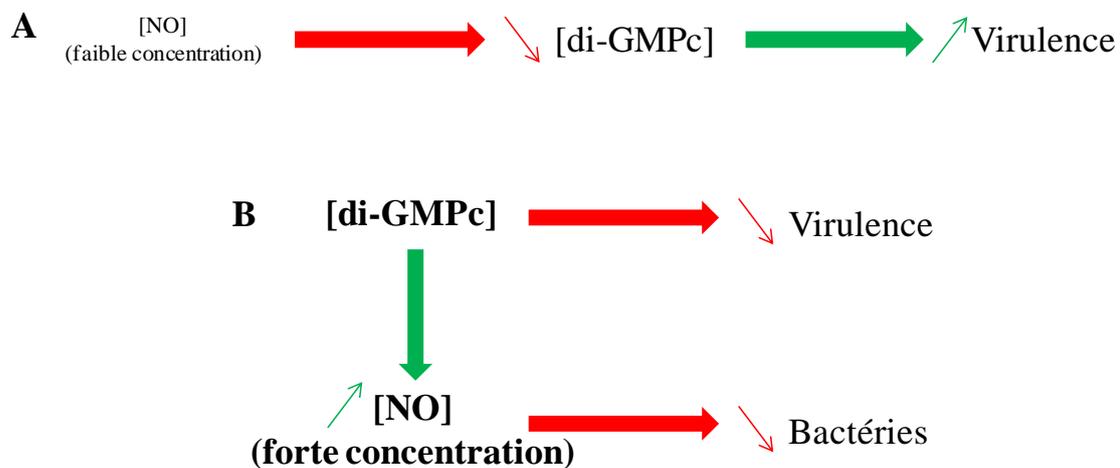


Figure 27 : Dialogue hôte-pathogène *via* le NO et le di-GMPc.

Lorsque le NO est présent en faible concentration, la concentration intracellulaire en di-GMPc diminue chez le pathogène, favorisant la virulence (**Figure 27A**). D'autre part, la production de di-GMPc chez le pathogène inhibe la virulence du pathogène d'une part et induit la synthèse de NO chez l'hôte d'autre part. Cette production accrue de NO conduit à la mort des bactéries pathogènes (**Figure 27B**). L'implantation du pathogène chez l'hôte dépend par conséquent de régulations fines de la concentration en di-GMPc chez celui-là.

Objectifs du travail de thèse

Lors des infections, les dialogues moléculaires mis en jeu entre l'hôte et le pathogène sont généralement la clé de l'évolution de la pathologie. Cependant, très peu de choses sont connues en ce qui concerne le dialogue moléculaire entre les EHEC et l'Homme. Il a été montré au laboratoire que le NO est un inhibiteur de la production de Stx chez les EHEC, et qu'à l'inverse les EHEC ont la capacité d'inhiber la production de NO par les cellules épithéliales humaines. D'autre part, le di-GMPc est un second messenger ubiquitaire, souvent impliqué dans la régulation de la virulence de diverses espèces bactériennes pathogènes. Le NO est capable de moduler l'activité de certaines DGC ou PDE, et donc de réguler la concentration en di-GMPc.

Avant mon arrivée au laboratoire, des analyses transcriptomiques ont permis de montrer que, chez la souche EHEC O157:H7 EDL933 :

- Le NO active l'expression de *gadE* et *gadX* et inhibe l'expression du LEE4
- Dans un mutant pour le gène *vmpA* codant une PDE spécifique du sérotype O157:H7 l'expression de *gadE* et *gadX* est activée alors que celle des gènes du LEE est réprimée

Les objectifs de ma thèse étaient :

- **d'éclaircir le rôle de GadE dans la régulation du LEE**
- **d'analyser le rôle de GadX dans la régulation du LEE**
- **d'identifier la cascade de régulation conduisant à la répression du LEE par le NO**
- **d'identifier l'activité protéique de VmpA**
- **d'analyser le rôle du di-GMPc chez les EHEC**
- **de regarder si l'effet du NO sur la régulation du LEE met en jeu la régulation de l'activité PDE de la protéine VmpA**

Chapitre I : Régulation de l'expression du LEE

Introduction

La sécrétion de protéines effectrices par le SSTT, conduisant à l'adhésion des EHEC aux cellules intestinales, et la production de Stx dans l'intestin sont les responsables majeurs de la virulence des EHEC O157:H7. La plupart des gènes requis pour l'adhésion des EHEC, dont les gènes codant pour le SSTT, sont portés par le LEE. La régulation de leur expression est très complexe, sous le contrôle de signaux extra et intracellulaires, et nécessite de nombreux régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels.

Avant mon arrivée au laboratoire, il avait été décrit que le NO produit par l'Homme, notamment dans l'intestin, était un inhibiteur de la synthèse de Stx chez la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 (Vareille *et al.*, 2007). Suite à ces travaux, une approche transcriptomique par puces à ADN pangénomiques avait été initiée afin de déterminer l'impact du NO sur l'expression globale des gènes de la souche EDL933. Il avait ainsi été observé que le NO réprime l'expression du LEE2 et du LEE4 de façon significative. Afin de savoir si la répression du LEE par le NO induisait une répression de l'adhésion, des infections de cellules épithéliales intestinales avaient été effectuées en présence ou en absence de NO, apporté par un donneur de NO (exogène) ou produit par les cellules (endogène). En présence de NO, il était observé une diminution de l'adhésion des EHEC, ce qui est corrélé avec les analyses transcriptomiques. Les données de transcriptomique montraient également une surexpression de l'expression de *gadE* et de *gadX*. Or, plusieurs études ont montré que GadE est un répresseur de l'expression du LEE chez les EHEC, et que GadX réprime l'expression du LEE chez les EPEC. Nous nous sommes donc intéressés à la cascade de régulation de l'expression du LEE par GadE et GadX, et nous avons émis l'hypothèse que le NO réprime l'expression du LEE en activant l'expression de *gadE* et *gadX*.

Matériels et Méthodes

Souches et plasmides utilisés

Les souches utilisées lors de mes travaux sont référencées dans le **Tableau 9**. La souche EHEC O157:H7 utilisée est la souche EDL933, isolée à partir de viande de bœuf lors de l'épidémie qui a eu aux USA en 1982 (O'Brien *et al.*, 1983).

Tableau 9 : Souches et plasmides utilisés

Souches et plasmides	Caractéristiques	Référence
Souches		
EDL933	Souche sauvage EHEC O157:H7	(O'Brien <i>et al.</i> , 1983)
$\Delta gadE$	EDL933 $\Delta gadE ::cat$; CamR	Unité de microbiologie, INRA Theix
$\Delta gadX$	EDL933 $\Delta gadX ::cat$; CamR	Ce travail
$\Delta gadE\Delta gadX$	EDL933 $\Delta gadE ::cat \Delta gadX ::km$; CamR KanR	Ce travail
Δler	EDL933 $\Delta ler ::km$; KanR	Ce travail
$\Delta nsrR$	EDL933 $\Delta nsrR ::km$; KanR	(Vareille <i>et al.</i> , 2007)
Plasmides		
pBAD33	Promoteur inductible à l'arabinose ; CamR Ori : pACYC184	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBADMycHisA	Promoteur inductible à l'arabinose ; étiquette 6-histidine en C-ter ; AmpR Ori : pBR322	Invitrogen
pBADHisA	Promoteur inductible à l'arabinose ; étiquette 6-histidine en N-ter ; AmpR Ori : pBR322	Invitrogen
pgadE	pBADMycHisA:: <i>gadE</i>	Ce travail
pgadX	pBADHisA:: <i>gadX</i>	Ce travail
pnsrR	pBADMycHisA:: <i>nsrR</i>	Ce travail
pHisler	pBADHisA:: <i>ler</i>	Ce travail
p33nsrR	pBAD33:: <i>nsrR</i>	Ce travail
pler	pBAD33:: <i>ler</i>	Ce travail
pKD46	Promoteur inductible à l'arabinose ; AmpR Ori : R101	(Datsenko & Wanner, 2000)

Construction des mutants isogéniques

Les mutants isogéniques ont été obtenus par la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Une cassette portant un gène de résistance à un antibiotique est amplifiée à partir d'ADNg au moyen d'amorces qui possèdent à leur extrémité 5' 50 pb qui correspondent à la séquence juste en amont du codon d'initiation de l'ORF du gène à muter pour l'amorce Forward, et à la séquence juste en aval du codon stop pour l'amorce Reverse. Le produit d'amplification est purifié sur colonne QiaQuick (Qiagen) et introduit dans la souche EDL933 qui possède le

plasmide pKD46 portant notamment un gène codant pour une recombinaise phagique sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Après culture de la souche EDL933 (pKD46) en présence de 10 mM d'arabinose et l'électroporation de celle-ci en présence du fragment de PCR portant la cassette de résistance à l'antibiotique, les recombinaises permettent la recombinaison homologue entre le fragment PCR et le chromosome bactérien. Les bactéries sont ensuite criblées sur des boîtes LB contenant l'antibiotique correspondant à la résistance conférée par l'échange d'allèle, et le plasmide pKD46 thermo-sensible est éliminé par culture à 42°C pendant une nuit. La présence de la mutation est vérifiée par PCR.

Construction des plasmides pour les complémentations

Pour la complémentation des différents mutants, les gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR à partir d'ADNg d'EDL933 à l'aide de l'ADN polymérase haute fidélité Pfx50 (Invitrogen). Les amorces permettant l'amplification du gène et le clonage par la suite contiennent :

1. Les séquences correspondant aux gènes du codon d'initiation au codon stop
2. Les sites de restriction des enzymes utilisées pour la digestion enzymatique des fragments de PCR

Les fragments PCR sont purifiés et digérés par les enzymes de restriction puis ligués dans les différents plasmides digérés eux aussi par les mêmes enzymes de restriction. Les plasmides recombinants obtenus ainsi que leurs caractéristiques sont présentés dans le **Tableau 9**.

Résistance à l'acidité

Les tests de résistance à l'acidité ont été effectués selon le protocole décrit par Large *et al.* (Large *et al.*, 2005). Les pré-cultures des différentes souches ont été réalisées en milieu LB avec antibiotique pendant une nuit à 37°C sous agitation. Pour la résistance à l'acidité dépendante de GadE, nous avonsensemencé 10 mL de LB additionné de glucose avec 50 µL de préculture. Pour la résistance à l'acidité dépendante de GadX, nous avonsensemencé 10 mL de LB sans glucose avec 50 µL de préculture. Après 24 h de culture, 5 mL de milieu EG à pH 2 (témoin négatif) et milieu EG à pH 2 + glutamate 0.3 % sontensemencés par 10⁷ CFU/mL et incubés sous agitation à 37°C. Des numérations à différents temps ont été effectuées sur milieu LB gélosé.

Milieux et conditions de culture

Les différentes souches bactériennes sont conservées en glycérol 20 % à -20°C et -80°C. Les bactéries sontensemencées en milieu DMEM et les précultures sont incubées une nuit à 37°C

sous agitation. Le lendemain, les précultures sont diluées au 1/100^{ème} dans du milieu DMEM et cultivées en présence ou absence de Nor-4 500 µM et présence ou absence de 0.5 mM d'arabinose pour l'induction de l'expression des gènes clonés dans les différents plasmides sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose.

Extraction de l'ADN génomique des EHEC

L'ADN génomique des EHEC est extrait à partir de 2 ml d'une culture bactérienne de 24 h. Lorsque l'ADN doit être utilisé pour des PCR de clonage ou des qPCR, l'ADN est extrait et purifié à l'aide du kit DNeasy® Tissue kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Lorsque l'ADN est utilisé uniquement pour une vérification, l'ADN est extrait par une technique de lyse par la chaleur. Deux mL de préculture sont centrifugés à 7 500 g pendant 6 min. Le culot bactérien est repris dans 1 mL d'H₂O. Cette suspension est centrifugée à nouveau à 7 500 g pendant 6 min. Le culot est repris dans 500 µL d'H₂O et est placé 10 min au bain marie à 95°C. Le lysat bactérien est centrifugé à 7 500 g pendant 6 min et le surnageant est prélevé et conservé à -80°C en attendant son utilisation.

Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par la méthode d'extraction au TRIzol. Les bactéries sont lysées dans du TRIzol pendant 10 min à température ambiante. Après ajout du chloroforme, les échantillons sont agités fortement pendant 30 s et centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. La partie aqueuse contenant les ARN est ensuite prélevée et mise en présence de 500 µL d'isopropanol pour la précipitation. Après 10 min de repos et 10 min de centrifugation à 12 000 g à 4°C, les ARN sont lavés à l'éthanol 75 %, puis le culot d'ARN après séchage est repris et solubilisé dans 30 µL d'H₂O traitée au DEPC 10 min à 56°C. La concentration ainsi que la pureté des ARN sont évaluées par spectrophotométrie (260 nm et 280 nm). Afin d'éliminer les traces d'ADN génomique, un traitement à la DNase I (Fermentas) est effectué à 37°C pendant 45 min.

Transcription inverse des ARNm

Les ARNm (1 µg) sont rétro-transcrits en ADNc en utilisant 3 µg d'amorces aléatoires (Random primers, Invitrogen), 10 mM de chaque dNTP, 0.2 mM de DTT et 100 U de SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen), dans un tampon de composition finale : 50 mM Tris-HCl, pH 8.3 à température ambiante, 75 mM KCl et 3 mM MgCl₂ (Invitrogen). La réaction se déroule à 42°C pendant 50 min, puis l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15 min.

PCR quantitative en temps réel

L'analyse de l'expression des gènes a été effectuée par PCR quantitative. Pour les conditions de culture que j'ai utilisées, j'ai analysé l'expression de différents gènes de ménage de référence décrits dans la littérature. J'ai analysé l'expression de *tufA*, qui code pour le facteur d'élongation EF-Tu, *rrlD*, qui code pour la sous-unité 23S de l'ARN ribosomal, *mdh*, qui code pour la malate déshydrogénase, et *rpoA*, qui code pour la sous-unité α de l'ARN polymérase. Le gène dont l'expression varie le moins dans les conditions de culture utilisées pour l'analyse de la régulation de l'expression du LEE est le gène *rpoA*. Nous avons donc utilisé ce dernier comme gène de ménage.

Obtention des courbes standards

Deux techniques différentes ont été utilisées pour l'obtention des courbes standards et donnent les mêmes résultats. La première technique consiste à amplifier les gènes un par un par PCR classique à l'aide d'amorces qui amplifient un fragment d'environ 500 pb. Ce produit de PCR est purifié sur colonne Strataprep (Stratagene) et quantifié par la mesure de son absorbance à 260 nm. On en déduit alors la concentration en ADN qui est transformée en nombre de molécules d'ADN (N) par μL ($N = [6,01 \cdot 10^{23} \times [\text{ADN}] (\text{g}/\mu\text{L}) / [660 (\text{ADN double brin}) \times \text{taille de l'amplicon (pb)}]]$). Le produit d'amplification est ensuite dilué dans le volume d' H_2O approprié pour avoir $5 \cdot 10^9$ molécules d'ADN/ μL . A partir de cette solution mère, des dilutions sériées décimales sont réalisées pour obtenir une gamme étalon. Cette gamme est ensuite utilisée comme matrice pour les qPCR afin d'obtenir des courbes standards. Par la suite, nous avons directement utilisé de l'ADNg de bactérie comme matrice, sans amplification préalable du gène d'intérêt. Des dilutions sériées décimales d'ADNg purifié d'EDL933 sont effectuées et utilisées comme matrice pour la gamme étalon de la même façon que les dilutions de fragments de PCR purifiés. Les deux méthodes donnent des résultats similaires, cependant, la deuxième méthode est plus facile et plus rapide à mettre en œuvre.

Quantification des ADNc

Les ADNc sont quantifiés en même temps que les gammes étalons. La PCR quantitative est effectuée sur 2 μL d'ADNc et sur 2 μL des dilutions sériées d'ADNg avec 0,5 μM des amorces des différents gènes d'intérêt. Le kit utilisé est Lonza (Takara) dans l'appareil Mastercycler® ep realplex (Eppendorf). Des contrôles sont effectués sur les échantillons d'ADN avant leur retro-transcription afin de s'assurer qu'il ne subsiste pas d'ADN.

Western-blot

Préparation et analyse des protéines du SSTT dans les surnageants de culture

Des précultures de chaque souche bactérienne ont été effectuées en milieu LB et incubées à 37°C sous agitation pendant 12 h, avant d'être diluées au 1 :100 dans 60 mL de milieu DMEM-HEPES 1 g/L de glucose avec L-glutamine. Après 6 h de culture avec ou sans 500 µM de Nor-4, les bactéries ont été centrifugées à 4 000 g pendant 30 min à 4°C et les surnageants ont été filtrés avec des filtres 0.45 µm. 60 mM de PMSF et 300 ng de DnaK ont été ajoutés aux surnageants avant la concentration de ces derniers sur des membranes qui retiennent les protéines de taille supérieure à 3 kDa (Amicon) selon les instructions du fabricant. Les concentrats ont ensuite été resuspendus dans 1.5 mL de Tris-HCl (1.5 M pH 8) et 0.2 M de NaDeoxycholate a été ajouté avant une incubation de 30 min sur glace. Une concentration finale de 10 % (v/v) de Trichloroacetic Acid (TCA) a été ajoutée aux échantillons mis à incuber une nuit à 4°C pour la précipitation des protéines. Les surnageants ont été centrifugés à 4°C à 4 000 g pendant 30 min, et les culots ont été séchés avant d'être repris dans 30 µL de TE. Ces échantillons ont été utilisés pour l'analyse en western-blot.

Détection des protéines

15 µL de chaque échantillon ont été utilisés par analyse. Le tampon de charge (Laemmli) a été ajouté avant la dénaturation des protéines 10 min à 95°C. Puis les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12 % et transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un système de transfert en semi-sec. Puis les membranes ont été saturées par 5 % (p/v) de Régilait dans du PBST (PBS 1X et Tween 20 0.1 % (v/v)) pendant 1 h 30 à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C avec les anticorps primaires correspondant dilués dans du PBST 1.25 % (p/v) Régilait. Les différents anticorps utilisés ainsi que la dilution recommandée et leur origine sont indiqués **Tableau 10**. Les anticorps ont été produits par le Groupe de Recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP) et le Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), dirigé par Josée Harel à l'université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, pour l'anticorps anti-EspB. L'anticorps anti-Tir provient du laboratoire de Gad Frankel « Molecular pathogenesis and dissemination of Gram-negative bacterial pathogens » de l'Imperial College (London, UK). L'anticorps anti-EspA provient du laboratoire de James B Kaper « Center for vaccine development » de l'«University of Maryland School of Medicine » (Baltimore, USA).

Tableau 10 : Différents anticorps utilisés pour les Western-blot, dilution recommandée et origine.

Anticorps	Dilution	Origine
espA	1:1 000	Lapin
espB	1:2 000	Lapin
tir	1:1 000	Lapin

Après 3 lavages de 5 min dans du PBST, l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin dilué au 1 :10 000 dans du PBST 1.25 % de Régilait (p/v) a été mis en contact de la membrane pendant 2 h à température ambiante avant 4 lavages de 5 min dans du PBST et 2 lavages de 2 min dans du PBS. La détection a été effectuée par le kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrates (Pierce) selon les instructions du fournisseur et les membranes ont été révélées par autoradiographie.

Retard sur gel

Obtention des protéines GadE et GadX purifiées

Des cultures de 100 mL (Probond resin de Invitrogen) ou de 200 mL (Talon® His-tag Purification Resins de Clontech) des souches hébergeant les plasmides GadE-6-His et GadX-6-His en milieu LB + 0.5 mM d'arabinose sont incubées sous agitation à 37°C pendant 4 h. Les bactéries sont centrifugées et resuspendues dans 8 mL de « native binding buffer » avant d'être lysées au cell disruptor. Les lysats sont stockés à -20°C. La purification des protéines non dénaturées est ensuite effectuée selon le protocole des fournisseurs des deux résines citées ci-dessus. Les protéines GadE-6-His et GadX-6-His sont dosées à l'aide du kit « BCA Protein Reagent kit » et conservées à -80°C en présence de 10 % de glycérol.

Expériences de retard sur gel

Principe de la technique : les ADN sont amplifiés par PCR avec des amorces étiquetées par la digoxygénine (dig). Ils sont ensuite mis en contact avec la protéine d'intérêt avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide qui sépare les molécules en fonction de l'encombrement stérique. Ensuite, les ADN sont transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis la détection se fait à l'aide d'anticorps dirigés contre la dig réagissant avec le CDP-star. La réaction émet de la lumière (chimiluminescence) qui est alors détectée par autoradiographie.

Les fragments correspondant aux promoteurs d'intérêt (**Figure 28**) sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces marquées à la dig (DIG, Eurofins MWG Operon). Un ng d'ADN amplifié correspondant à chaque région des promoteurs d'intérêt est mis en contact 30 min à 25°C avec différentes concentrations de protéine, en présence de Tris-HCl (pH 7.4, 10 mM) ; EDTA (pH 8, 1 mM) ; DTT (1 mM) ; BSA (400 µG/mL) ; polyDIDC (100 µG/mL) ; KCl (50 mM) ; NaCl (50 mM). L'ADN des différents échantillons est séparé à 120V sur un gel de polyacrylamide : TBE

1X (5 mL) ; Acrylamide 30% (2 mL) ; H₂O (2.5 mL) ; Glycérol 80% (312 µL) ; persulfate d'ammonium (APS) 10% (150 µL) et TEMED (10 µL). Puis le transfert sur membrane de nitrocellulose est effectué pendant 30 min à 10 V dans du TBE 0.5X. Un lavage de 5 min dans du PBS 1X est effectué avant la fixation aux UV de l'ADN sur la membrane. Deux lavages au PBS Triton 0.1% sont effectués avant un lavage rapide dans le Wash Buffer (Dig wash & block buffer set, Roche) puis la saturation 30 min dans la blocking solution (Dig wash & block buffer set, Roche). Le marquage spécifique de l'ADN est effectué par un bain de 30 min dans la blocking solution (Dig wash & block buffer set, Roche) qui contient l'anticorps anti-DIG dilué au 1 :20 000, avant deux lavages de 15 min dans le washing buffer (Dig wash & block buffer set, Roche) et l'équilibrage dans 20 mL de la solution de détection (Dig wash & block buffer set, Roche) pendant 3 min. L'ADN est détecté par 500 µL de CDP-star après 5 min d'incubation et les membranes sont révélées par autoradiographie.

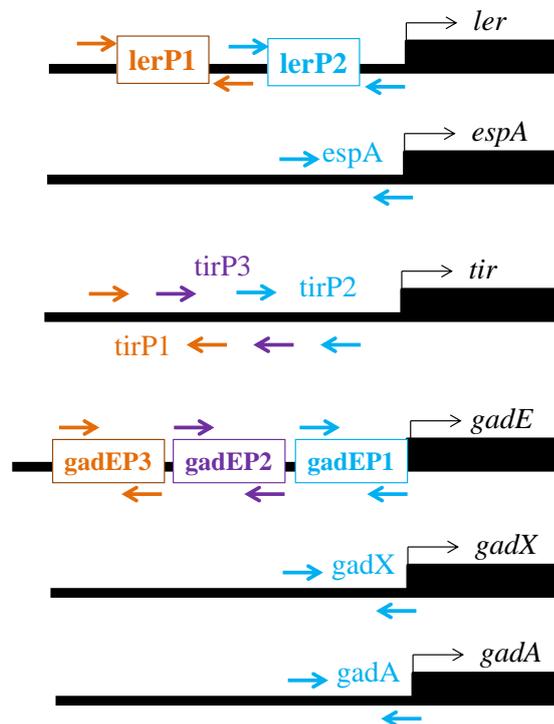


Figure 28 : Représentation schématique des différentes régions promotrices amplifiées pour les retards sur gel et les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Les encadrés représentent les différents promoteurs d'une région, les noms non encadrés représentent uniquement une région promotrice.

Immunoprécipitation de la chromatine

Principe de la technique (**Figure 29**) : le but est de connaître l'interaction moléculaire entre une protéine régulatrice et une région promotrice.

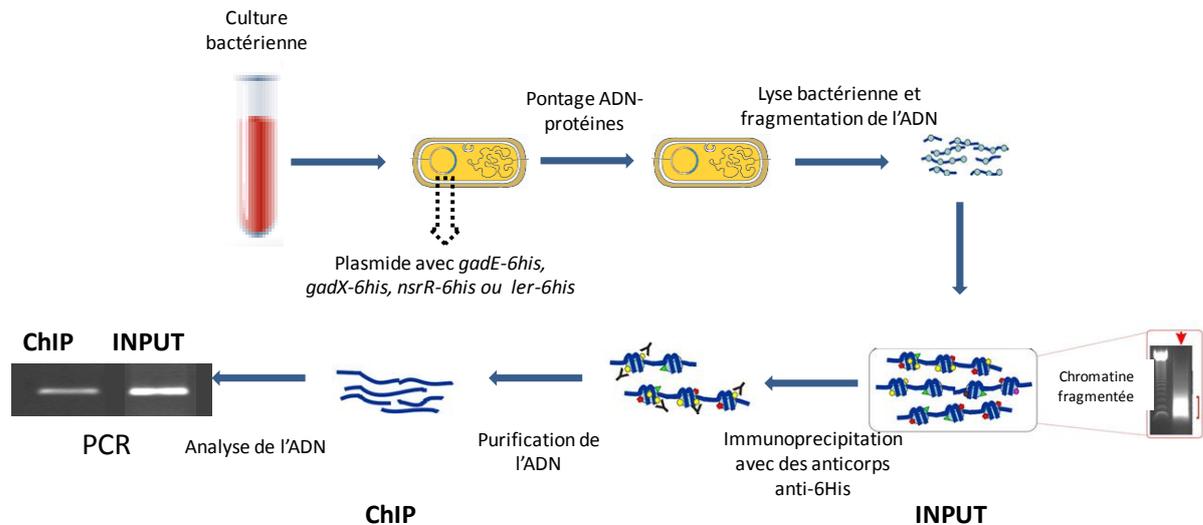


Figure 29 : Principe de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine.

Les bactéries hébergeant un plasmide recombinant codant pour les protéines d'intérêt étiquetées 6-histidines sont cultivées. Un pontage entre l'ADN et les protéines est effectué avant la lyse bactérienne et la fragmentation de l'ADN par sonication. On obtient l'ADN total ou INPUT. Ensuite, les protéines étiquetées 6-histidines sont immunoprécipitées par des anticorps spécifiques. L'ADN est purifié : on obtient la partie immunoprécipitée ou ChIP. L'ADN est ensuite analysé par qPCR.

Les plasmides recombinants *pgadE*, *pgadX*, *pnsrR*, *pHisler* ont été électroporés dans les mutants respectifs afin d'éviter les interférences avec les protéines natives. Des précultures en milieu LB + antibiotique ont été effectuées pour chaque souche à 37°C sous agitation et diluées le lendemain dans 25 mL de milieu DMEM + HEPES (10 mM) avec ou sans Nor-4. L'expression des protéines a été induite par l'ajout de 0.5 mM de L-arabinose. Après 6 h de culture à 37°C sous agitation, l'immunoprécipitation de la chromatine a été effectuée selon le protocole de Lanois *et al.*, (Lanois *et al.*, 2008) avec de petites modifications : des liaisons covalentes ont été formées entre l'ADN et les protéines par l'ajout de formaldéhyde (1 % final) à température ambiante pendant 30 min. Puis les bactéries ont été centrifugées à 4 500 g à 4°C pendant 7 min et le culot a été lavé 2 fois par du PBS froid. Les culots ont été ensuite resuspendus dans 0.7 mL de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 % sucrose) contenant du lysozyme (10 mg/mL) et incubés 30 min à 37°C. 0.7 mL de

tampon IP 2X (100 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 2 % Igepal CA-630, 0.5 % NaDeoxycholate) contenant 1 mM de PMSF (anti protéases) a été ajouté à chaque échantillon avant 15 min d'incubation à 37°C. Les échantillons ont ensuite été refroidis sur glace avant la sonication qui permet de casser les membranes bactériennes mais également de fragmenter l'ADN ([sonication 15 s à 50 % d'amplitude et repos 1 min sur glace] répété 11 fois). 0.7 mL de chaque échantillon a été stocké à -80°C. 50 µL de chaque échantillon (INPUT) ont été incubés avec 100 µL de solution de protéinase K (36 µg de protéinase K dans 100 µL de TE) pendant 2 h à 37°C et 8 h à 67°C pour dégrader les protéines et libérer l'ADN. L'ADN a été purifié à l'aide du kit Qiaquick (Qiagen). L'immunoprécipitation a été effectuée en ajoutant des anticorps monoclonaux anti-Histidine (0.3 µg). Les échantillons ont été incubés sous agitation douce pendant 2 h à température ambiante avant l'ajout de 40 µL de protéine G sepharose 50 % incubée avec l'échantillon pendant 1 h à température ambiante. La protéine G sepharose se fixe spécifiquement aux anticorps afin de permettre leur précipitation. Les billes ont été lavées 2 fois avec le tampon IP 1X : 5 min d'agitation, et centrifugation pendant 1 min à 9 500 g. Puis deux lavages de la même façon avec le tampon de lavage CHIP (10 mM TrisHCl pH 8, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Igepal CA-630, 0.5 % NaDeoxycholate) ont été effectués avant 2 lavages avec 1 mL de TE. Les billes ont alors été resuspendues dans 100 µL de tampon d'éluion (50 mM TrisHCl pH 8, 10 mM EDTA, 1 % SDS) et incubées 15 min à 65°C avant une centrifugation à 9 500 g pendant 1 min. Le surnageant qui contient la fraction immunoprécipitée (CHIP) de l'ADN est collecté et une solution de protéinase K (0.036 mg/mL) est ajoutée avant une incubation de 2 h à 37°C et 8 h à 65°C. Les échantillons d'ADN ont ensuite été purifiés par le kit Qiaquick (Qiagen). Les fractions CHIP et INPUT sont alors analysées par qPCR dans l'appareil Eppendorf Mastercycler® ep *realplex* (eppendorf). Les expériences ont été effectuées en duplicats ou triplicats biologiques indépendants.

L'enrichissement relatif pour chaque cible ADN (**Figure 28**) a été calculé comme suit pour chaque protéine : les promoteurs d'intérêt ainsi que la région intragénique de *rpoA* ont été amplifiés avec des amorces spécifiques. Pour chaque cible d'ADN, nous avons calculé le ratio : nombre de copies du fragment dans la fraction CHIP/nombre de copies du fragment dans la fraction INPUT. Chaque ratio a ensuite été divisé par le ratio obtenu pour la région intragénique de *rpoA* afin d'éliminer les interactions non-spécifiques. C'est le ratio 6His-protéine. Le même ratio a été calculé avec la souche parentale EDL933 contenant le plasmide vide. C'est le ratio 6His-contrôle. L'enrichissement relatif a été calculé comme suit : 6His-protéine/6His-contrôle,

afin d'éliminer les interactions non spécifiques qui peuvent avoir lieu avec la queue poly-histidine seule. Pour la représentation graphique, nous avons multiplié les ratios par 10, et nous avons considéré qu'une valeur d'enrichissement relatif supérieur à 2 fois le contrôle (au dessus de 20) correspond à la fixation de la protéine sur le promoteur cible.

Résultats

1. Organisation de l'opéron du LEE

Le LEE est organisé en 5 opérons majeurs. L'organisation des différents opérons du LEE ainsi que les gènes principaux codés par chacun d'entre eux sont présentés **Figure 30**.



Figure 30 : Organisation des différents opérons du LEE et gènes principaux codés par chacun d'entre eux.

Pour l'étude, nous avons analysé l'expression des gènes *ler* (LEE1), *sepZ* (LEE2), *escV* (LEE3), *tir* (LEE5), *eae* (LEE5) et *espA* (LEE4).

2. Confirmation des résultats d'analyse transcriptomique par qRT-PCR

Afin de confirmer les résultats des analyses transcriptomiques réalisées auparavant au laboratoire à l'aide de puces à ADN, indiquant que le NO réprime l'expression de certains gènes du LEE et active celle de *gadE*, des qRT-PCR ont été effectuées sur les gènes du LEE *ler*, *sepZ*, *escV*, *espA*, *tir* et *eae*, ainsi que sur les gènes de l'AFI *gadE* et *gadX*. Les analyses en qRT-PCR confirment la répression de l'expression de *espA* ainsi que la surexpression de *gadE* en présence de NO (**Figure 31**). Elles montrent que le NO réprime également l'expression de *ler*, *tir* et *eae* et active l'expression de *gadX*, contrairement aux résultats de transcriptomique où l'expression de ces gènes ne semblait pas être altérée en présence de NO. D'autre part, *sepZ* est surexprimé en présence de NO, ce qui est contraire aux observations faites en transcriptomique où l'expression de *sepZ* était réprimée par le NO. Enfin, le NO n'affecte pas l'expression de *escV*. La qRT-PCR est une technique plus sensible et plus fiable que les puces à ADN. Ceci explique la différence des résultats obtenus avec les deux techniques.

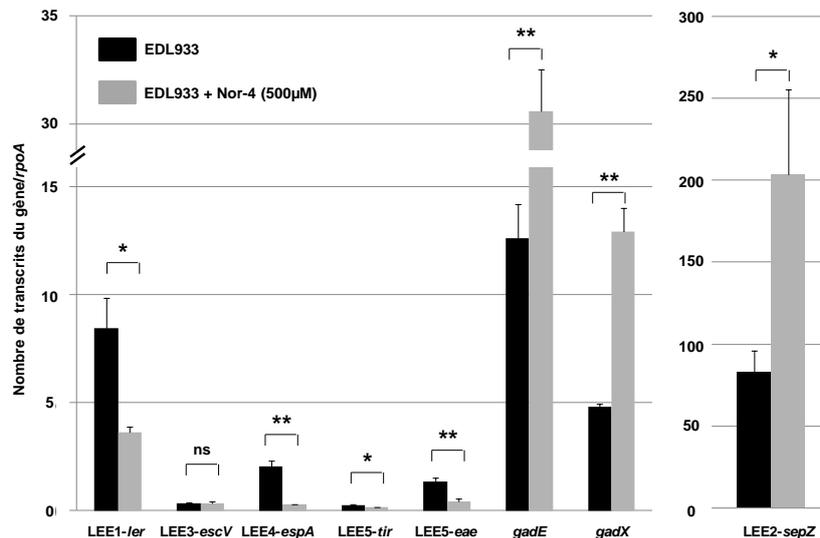


Figure 31 : Quantification des ARNm de différents gènes du LEE et de *gadE* et *gadX* dans la souche EDL933 incubée pendant 6h en absence ou en présence du donneur de NO : NOR-4.

En conclusion, la présence de NO dans le milieu réprime l'expression du LEE1, LEE4 et LEE5, n'a aucun effet sur l'expression du LEE3 et active l'expression du LEE2, *gadE* et *gadX*.

3. Construction des différents mutants nécessaires à l'étude et complémentation

Afin d'étudier la cascade de régulation de *gadE*, *gadX* et des différents opérons du LEE, nous avons construit des mutants isogéniques et nous les avons trans-complémentés avec des plasmides recombinants portant les gènes correspondants.

Courbes de croissance des différentes souches

Les mutants isogéniques Δ *gadE* et Δ *nsrR* étaient déjà disponibles au laboratoire. Les mutants Δ *gadX*, Δ *ler*, Δ *gadE* Δ *gadX* ont été construits ainsi que les mutants complémentés Δ *gadE*(*pgadE*), Δ *gadX*(*pgadX*), Δ *ler*(*pler*), Δ *ler*(*pHisler*) et Δ *nsrR*(*pnsrR*). La croissance de toutes ces souches en milieu DMEM a été étudiée. Nous pouvons voir sur la **Figure 32** que la croissance de toutes les souches utilisées est similaire à la croissance de la souche sauvage.

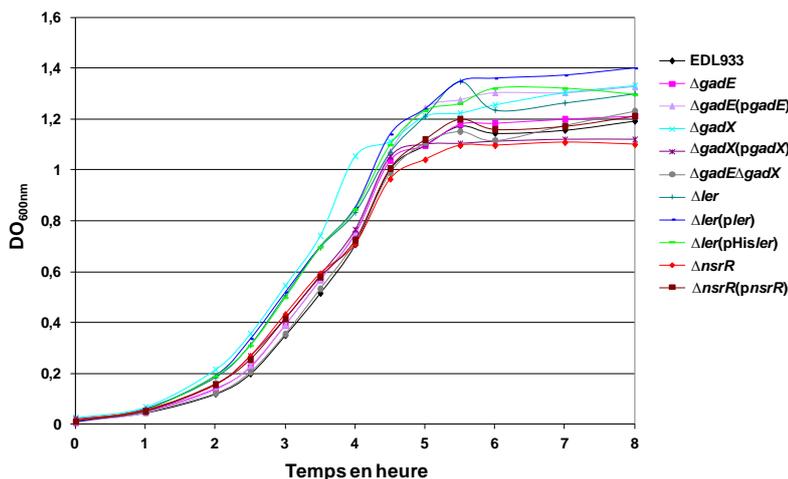


Figure 32 : Courbes de croissance des différentes souches utilisées pour l'étude en milieu DMEM + Hépès 10 mM.

Résistance à l'acidité des souches $\Delta gadE(pgadE)$ et $\Delta gadX(pgadX)$

Les gènes *gadE* et *gadX* codent pour des régulateurs de l'AFI. Il est bien connu que GadE est important pour la survie des EHEC O157:H7 souche Sakai à pH acide (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Le rôle de GadX dans la survie des *E. coli* n'a pas été déterminé. Nous avons donc vérifié que GadE est nécessaire à la survie de la souche EHEC EDL933 en milieu acide et que le gène *gadE* cloné code pour une protéine fonctionnelle. D'autre part, nous avons analysé le rôle de GadX dans la survie de la souche EHEC EDL933 en milieu acide (**Figure 33**).

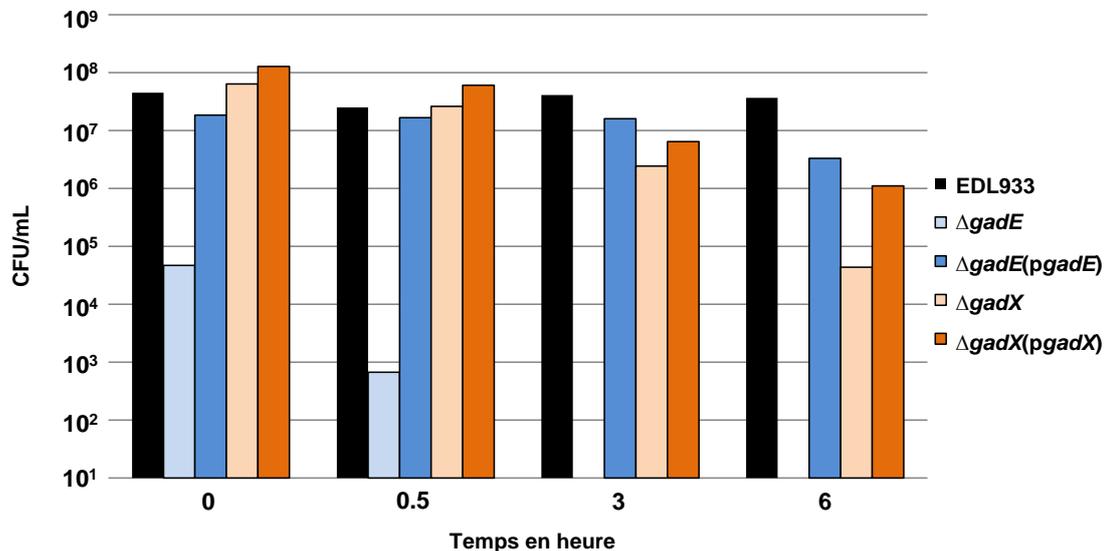


Figure 33 : Résistance à l'acidité dans la souche sauvage de référence EDL933, dans les mutants $\Delta gadE$ et $\Delta gadX$, et dans les mutants complémentés $\Delta gadE(pgadE)$ et $\Delta gadX(pgadX)$ en milieu EG 0.3% glutamate à t=0, t=0.5h, t=3h et t=6h post-inoculation.

La souche sauvage résiste très bien à pH 2 puisqu'à 6 h, on dénombre autant de bactéries que le nombre inoculé (**Figure 33**). En revanche, à partir de 3 h post-inoculation, le mutant $\Delta gadE$ ne survit pas et le mutant $\Delta gadX$ présente un défaut de résistance par rapport à la souche sauvage. Les mutants complémentés $\Delta gadE(pgadE)$ et $\Delta gadX(pgadX)$ restaurent la résistance à l'acidité observée dans la souche sauvage. Les gènes *gadE* et *gadX* clonés dans les plasmides recombinants codent donc pour des protéines actives.

4. Rôle de Ler dans la régulation de l'expression du LEE, de *gadE* et de *gadX* par le NO

Analyse transcriptionnelle

Nous avons tout d'abord analysé le rôle de Ler dans la régulation de l'expression des gènes du LEE et de *gadE* et *gadX* par le NO. Pour cela, nous avons réalisé des qRT-PCR sur des ADNc de la souche sauvage, du mutant Δler et du mutant Δler complémenté, soit par *pler* soit par *pHisler* en absence ou en présence de Nor-4. Le nombre de transcrits des différents gènes est

normalisé par le nombre de copies du gène de ménage *rpoA* et ramené au pourcentage du nombre de transcrits quantifiés dans la souche sauvage en absence de NO (Figure 34).

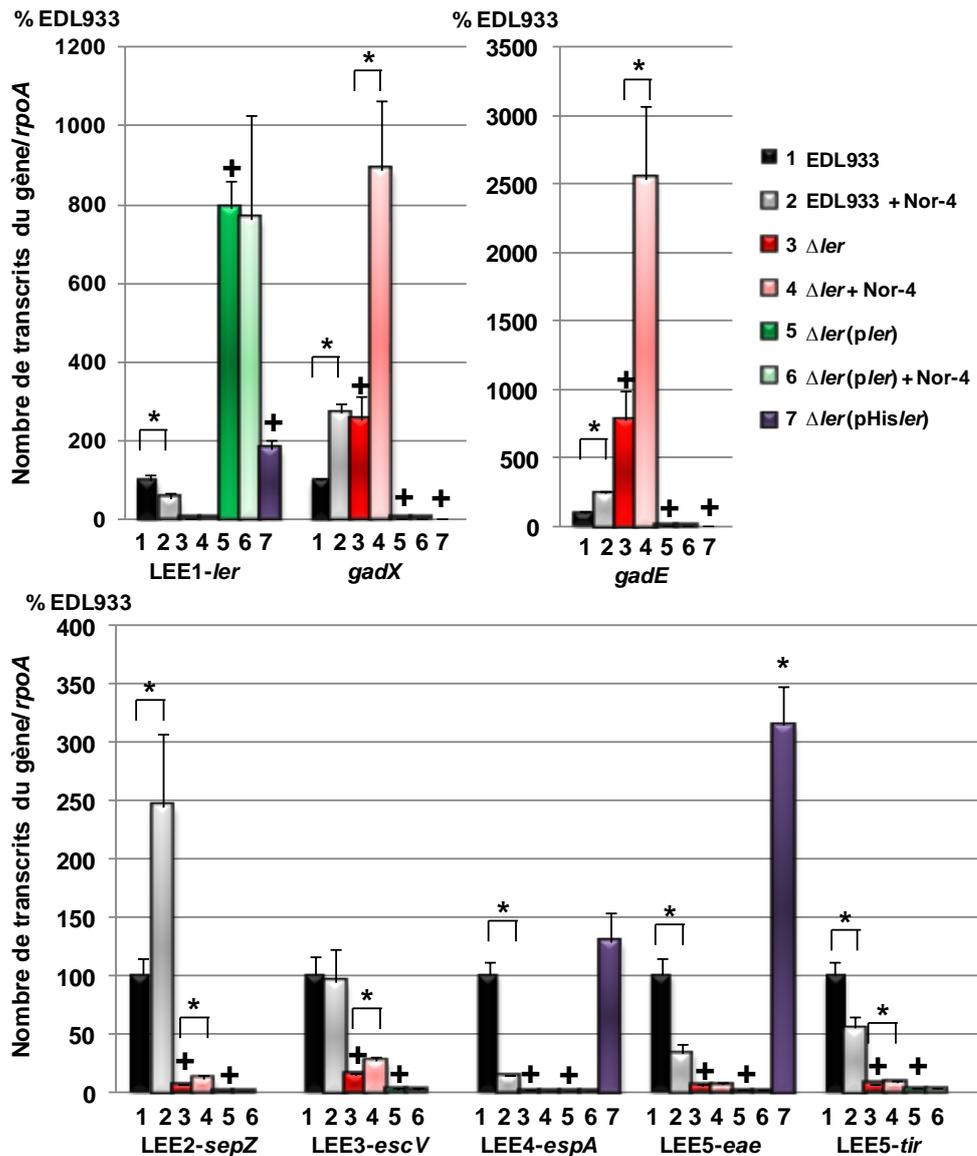


Figure 34 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE (indiqués en abscisse) dans la souche sauvage, le mutant Δler et le mutant Δler complémenté par *pler* ou *pHisler* en absence ou en présence de Nor-4. Test *t* de Student : + : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la souche sauvage sans NO ; * : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la même souche sans NO (n=3).

En absence de NO, dans le mutant complémenté $\Delta ler(pIer)$, *ler* est surexprimé 8 fois alors qu'il est surexprimé 2 fois dans le mutant complémenté $\Delta ler(pHisler)$ par rapport à la souche sauvage (Figure 34).

Concernant l'expression de *gadX*, on observe plus de transcrits *gadX* dans le mutant Δler que dans la souche sauvage, indiquant que *Ler* réprime l'expression de *gadX*. Cette répression est confirmée lorsque *ler* est surexprimé. D'autre part, l'expression de *gadX* est toujours activée par

le NO dans le mutant Δler , indiquant que Ler n'est pas le régulateur impliqué dans l'activation de l'expression de *gadX* par le NO.

De la même façon, nous pouvons voir que Ler réprime l'expression de *gadE* et qu'il n'est pas le régulateur requis pour l'activation de l'expression de *gadE* par le NO.

Ler est connu comme l'activateur principal des autres opérons du LEE. Nous avons donc regardé ce qu'il en était dans nos conditions de culture. En absence de NO il est clair que Ler active l'expression des opérons LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5. En présence de NO, l'expression du LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 est trop faible pour qu'on puisse conclure sur l'activité inhibitrice du NO en absence de Ler.

Dans le mutant Δler complémenté par *pler* l'expression de *gadE* et *gadX* est réprimée comparativement à la souche sauvage. L'expression de *gadE* et *gadX* est donc restaurée et même exacerbée par rapport à celle observée dans la souche sauvage. L'expression de tous les opérons du LEE est fortement réprimée dans le mutant Δler complémenté par *pler*. Ceci est surprenant car Ler est connu pour être un activateur de l'expression des opérons LEE2 à LEE5. Nous nous sommes demandé si cette répression n'est pas due à une trop forte expression de *ler*. Nous avons alors analysé l'expression du LEE4 et du LEE5 dans le mutant Δler complémenté par *pHisler*, où le gène *ler* est moins surexprimé que dans le mutant Δler complémenté par *pler*. L'expression du LEE4 est restaurée et l'expression du LEE5 est activée comparativement à l'expression dans la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que l'effet de Ler sur les différents opérons du LEE est dépendant du taux d'expression de *ler*.

Analyse fonctionnelle

Afin de voir si Ler régule l'expression de *gadE* et *gadX* en se fixant directement sur leurs promoteurs respectifs, nous avons fait des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Pour cela, nous avons utilisé le mutant Δler complémenté par le vecteur *pHisler*, qui apporte la protéine Ler étiquetée d'une queue poly-histidine. Nous utilisons comme souche hébergeant ce plasmide : le mutant Δler afin d'éviter que la protéine native non étiquetée n'entre en compétition. La souche sauvage hébergeant le plasmide vide ainsi que le mutant Δler complémenté par le *pHisler* ont été traités de façon identique pour l'immunoprécipitation de la chromatine. Pour chaque souche, une fraction « INPUT » avant l'immunoprécipitation ainsi qu'une fraction « IP » après l'immunoprécipitation ont été obtenues. L'analyse des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine a été effectuée par qPCR. Nous avons amplifié par qPCR les fragments indiqués dans le **Tableau 11**, et calculé le nombre de copies à l'aide d'une gamme étalon.

nom	Région
<i>rpoA</i>	Région intragénique du gène <i>rpoA</i>
<i>gadX</i>	Promoteur de <i>gadX</i>
<i>gadEP1</i>	Promoteur proximal de <i>gadE</i>
<i>gadEP2</i>	Promoteur intermédiaire de <i>gadE</i>
<i>gadEP3</i>	Promoteur distal de <i>gadE</i>
<i>lerP1</i>	Promoteur distal de <i>ler</i>
<i>lerP2</i>	Promoteur proximal de <i>ler</i>
<i>espA</i>	Promoteur de <i>espA</i>
<i>tirP1</i>	Région promotrice -305 de <i>tir</i>
<i>tirP2</i>	Région promotrice -104 de <i>tir</i>
<i>tirP3</i>	Région promotrice -204 de <i>tir</i>

Tableau 11 : Nom et région correspondante des différents fragments amplifiés en qPCR pour l'analyse des immunoprécipitations de la chromatine.

Pour chaque fragment amplifié nous avons d'abord calculé le ratio « nombre de copies IP/nombre de copies INPUT », puis nous avons divisé ce ratio par celui obtenu pour *rpoA*, notre contrôle d'ADN non spécifique immunoprécipité. Nous avons fait le rapport de ce dernier obtenu pour la souche contenant la protéine étiquetée par la queue poly-histidine, sur le ratio obtenu par le même calcul pour la souche sauvage hébergeant le plasmide vide. Ce dernier ratio permet d'éliminer l'immunoprécipitation résiduelle qui peut avoir lieu par la fixation non spécifique de la queue poly-histidine sur de l'ADN. Arbitrairement, nous avons multiplié les rapports par 10, et avons considéré qu'un taux d'enrichissement supérieur à 20 (deux fois celui du contrôle) correspond à une fixation spécifique de la protéine étudiée.

Pour vérifier que l'ajout de l'étiquette poly-histidine permet toujours la fixation de Ler sur les promoteurs de ses gènes cibles, nous avons regardé le taux d'enrichissement des promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5 (**Figure 35**).

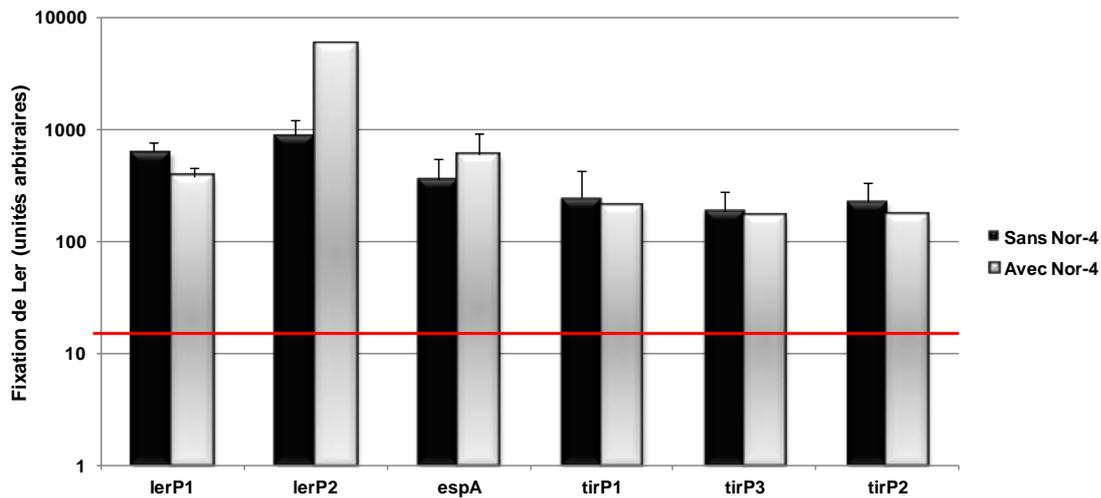


Figure 35 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec Ler étiqueté poly-histidine, en absence ou en présence de Nor-4 (n=2).

La **Figure 35** montre que Ler se fixe sur tous les promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5, en absence ou en présence de Nor-4. Ler est connu pour se fixer sur le promoteur du LEE1 pour réprimer sa propre expression et sur les promoteurs des opérons LEE2 à LEE5 pour en activer l'expression. Nos résultats montrent que la protéine Ler utilisée dans les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine est fonctionnelle et que les conditions de notre expérience sont correctes.

Nous avons ensuite analysé la fixation de Ler sur les promoteurs de *gadE* et *gadX*. La **Figure 36** montre les taux d'enrichissement du promoteur de *gadX* et des promoteurs de *gadE* décrits par (Sayed & Foster, 2009).

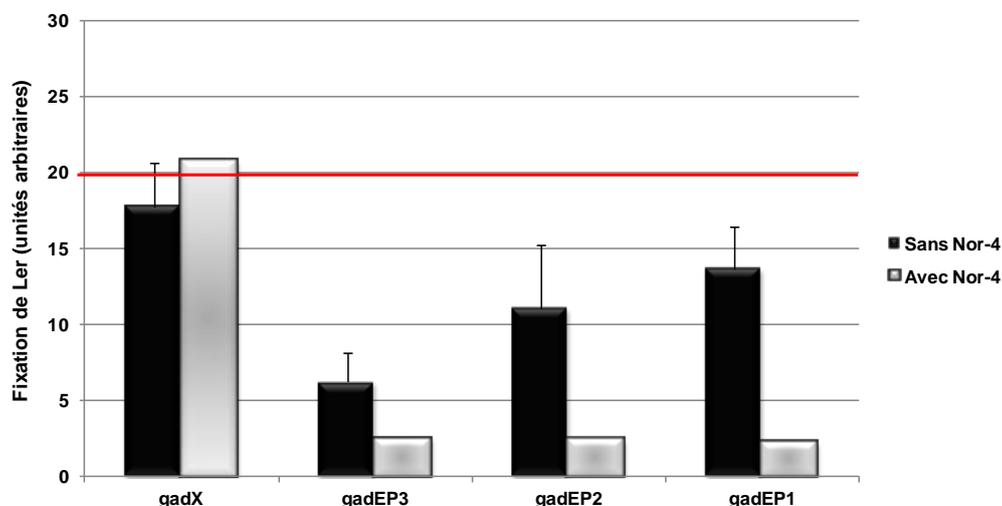


Figure 36 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de *gadX* et *gadE* immunoprécipitées avec Ler étiqueté poly-histidine, en absence ou en présence de Nor-4 (n=2).

Nous pouvons voir que Ler ne se fixe sur aucune des 4 régions amplifiées en absence ou en présence de NO (**Figure 36**).

En conclusion, nous avons montré que Ler réprime l'expression de *gadE* et de *gadX*. Cette répression est indirecte et nécessite un intermédiaire. De plus, nous avons montré que l'activité de Ler dépend de son taux d'expression. Lorsqu'il est fortement surexprimé, il réprime l'expression des autres opérons du LEE, alors que c'est un activateur lorsque le taux d'expression est similaire ou légèrement supérieur à celui de la souche sauvage.

5. Rôle de GadE dans la régulation de l'expression du LEE et de *gadX* par le NO

Analyse transcriptionnelle

De la même façon que pour Ler, l'étude du rôle de GadE dans la régulation de *gadX* et des différents gènes du LEE a été effectuée par qRT-PCR sur des ADNc de la souche sauvage, du mutant $\Delta gadE$ et du mutant $\Delta gadE$ complémenté par *pgadE*, en absence ou en présence de Nor-4 (**Figure 37**).

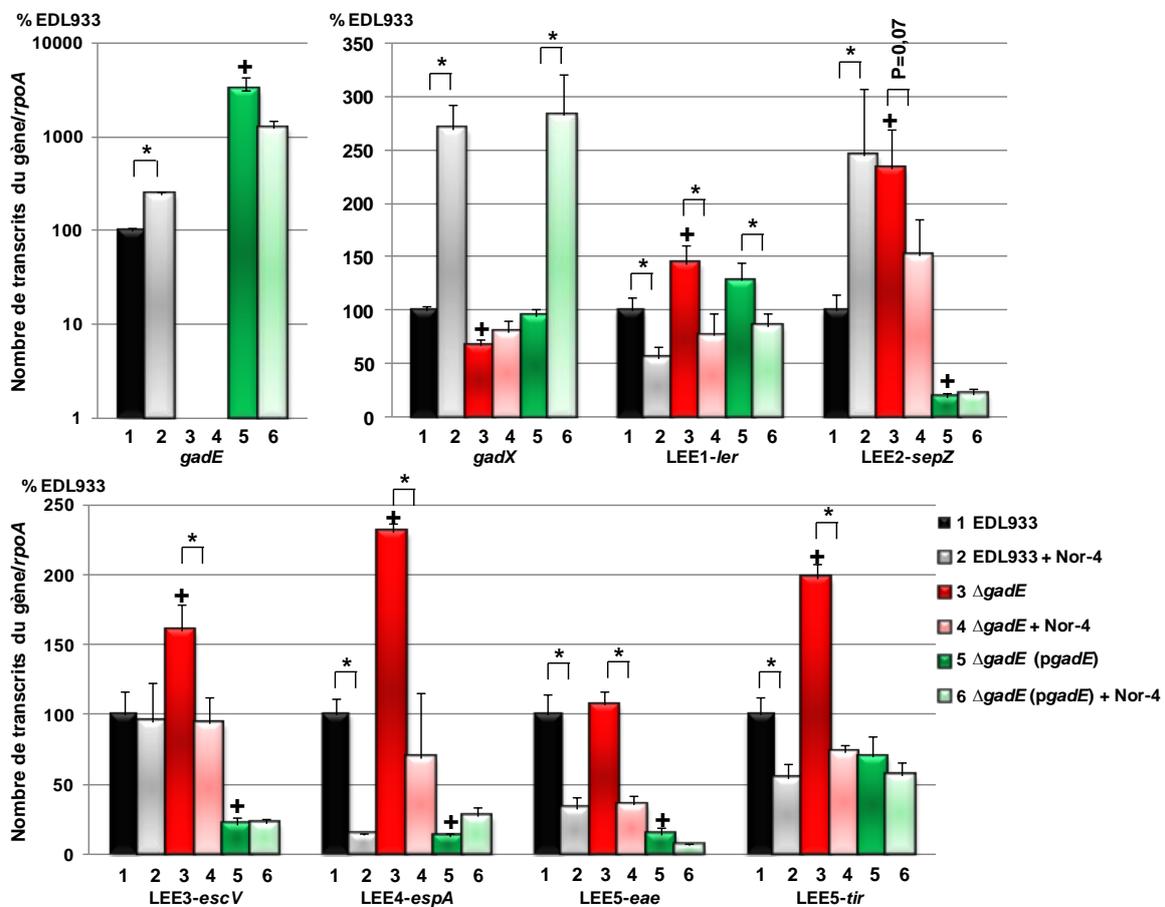


Figure 37 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE dans le mutant $\Delta gadE$ et le mutant $\Delta gadE$ complémenté par *pgadE* en absence ou en présence de Nor-4. Test *t* de Student : **+ : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la souche sauvage sans NO ; * : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la même souche sans NO (n=3).**

Le gène *gadE* est fortement surexprimé (31 fois) dans le mutant Δ *gadE* complémenté par *pgadE* (**Figure 37**). Il est important de noter que l'activation de l'expression de *gadE* par le NO n'est pas restaurée dans le mutant Δ *gadE* complémenté par *pgadE* puisque ce dernier est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose et est donc exprimé de la même façon en absence ou en présence de NO. GadE active l'expression de *gadX*. De plus l'activation de l'expression de *gadX* en présence de NO est abolie dans le mutant Δ *gadE*, montrant que GadE est impliqué dans cette activation. L'expression de *gadX* et son activation par le NO sont restaurées dans le mutant Δ *gadE* complémenté.

En ce qui concerne le LEE, GadE réprime l'expression de *ler* (LEE1), mais la répression de *ler* par le NO n'est pas abolie dans le mutant Δ *gadE*. Il y a donc un autre régulateur qui réprime *ler* en présence de NO. L'expression de *ler* est partiellement restaurée dans le mutant Δ *gadE* complémenté. GadE réprime également l'expression de *sepZ* (LEE2), mais l'activation par le NO observée dans la souche sauvage est abolie dans le mutant Δ *gadE*. De plus, dans le mutant Δ *gadE* complémenté, l'expression de *sepZ* est réprimée aussi bien en absence qu'en présence de NO. De la même façon, GadE réprime l'expression de *escV* (LEE3), et contrairement aux observations faites dans la souche sauvage, on observe une répression par le NO dans le mutant Δ *gadE*. Ceci suggère qu'il y a un régulateur intermédiaire répondant au NO qui réprimerait l'expression de *escV* dans le mutant Δ *gadE*. La surexpression de *gadE* réprime l'expression de *escV*, confirmant l'activité répressive de GadE sur l'expression de *escV*. De la même façon, GadE réprime l'expression de *espA* (LEE4) et de *tir* (LEE5) et n'est pas impliqué dans la répression de ces derniers par le NO. L'expression de *eae* (LEE5) est similaire dans le mutant Δ *gadE* et dans la souche sauvage en absence ou en présence de NO. Cependant, la surexpression de *gadE* conduit à la répression de *eae*. Lorsque *gadE* est exprimé à partir de son promoteur naturel dans la souche sauvage, GadE n'a donc pas d'effet sur l'expression de *eae* alors qu'il réprime lorsqu'il est présent en forte concentration. Il est également important de noter que dans le mutant Δ *gadE* complémenté l'expression du gène *ler* est seulement partiellement restaurée, alors que l'expression de *sepZ*, *escV*, *espA* et *eae* est fortement réprimée. Ceci suggère que *gadE* réprime l'expression de ces derniers gènes indépendamment de Ler.

Analyse fonctionnelle

Afin de savoir si GadE régule directement l'expression des opérons LEE1, LEE4 et LEE5, nous avons étudié sa fixation *in vitro* par des expériences de retard sur gel. La protéine GadE a été produite par les bactéries recombinantes et purifiée à l'aide de deux résines disponibles au laboratoire : la résine Talon et la résine probond. Après la purification de la protéine GadE

produite par les bactéries, un western-blot a été effectué afin de vérifier la présence de la protéine GadE-6His (**Figure 38**).

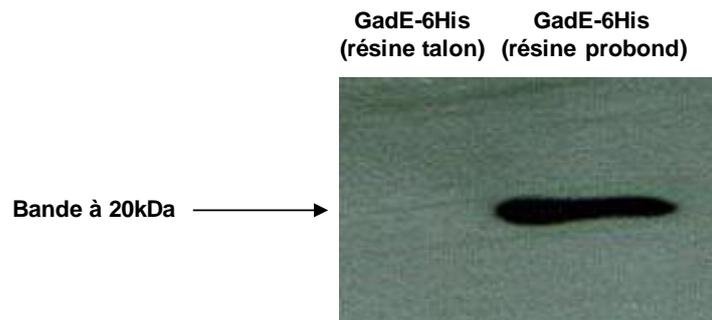


Figure 38 : Western-blot effectué sur les produits de purification de la protéine GadE-6His avec les deux résines disponibles au laboratoire: résine Talon et résine probond.

La **Figure 38** montre une bande de détection correspondant à la migration d'une bande de masse moléculaire de 20 kDa identique à celle de GadE dans l'échantillon purifié avec la résine probond. Cette bande est absente dans l'échantillon purifié avec la résine Talon. Nous avons donc utilisé par la suite la protéine GadE purifiée avec la résine probond pour effectuer les retards sur gel.

GadE se fixe sur le promoteur de *gadA* à pH acide chez *E. coli* K-12 (Hommais *et al.*, 2004 ; Ma *et al.*, 2003). Rien n'a été démontré chez les EHEC, mais les séquences nucléotidiques des gènes *gadE* chez la souche d'*E. coli* K-12 MG1655 et chez la souche EHEC EDL933 sont identiques (<http://biocyc.org> et <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). De plus, la « gad box » dans le promoteur de *gadA* est conservée entre les deux souches, suggérant que GadE se fixe également sur le promoteur de *gadA* chez les EHEC. En contrôle positif, nous avons donc regardé si la protéine GadE que nous avons purifiée se fixe sur la région promotrice de *gadA*.

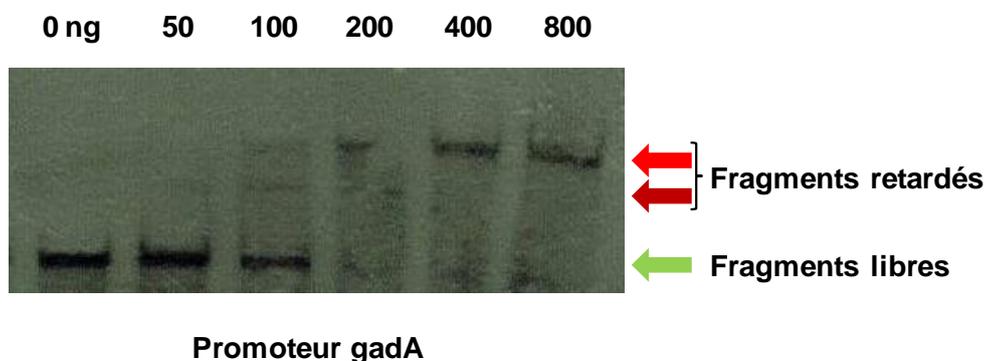


Figure 39 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de *gadA* sans protéine GadE ou avec différentes quantités : 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800 ng.

Nous observons sur la **Figure 39** que la région promotrice de *gadA* présente un retard de migration à partir de la quantité 100 ng de protéine GadE ajoutée. La protéine GadE étiquetée

avec une queue poly-histidine est donc fonctionnelle. On note également qu'il y a deux bandes retardées à 100 et 200 ng de protéine GadE. Il y a donc deux complexes ADN-protéine différents formés, l'un étant plus volumineux que l'autre. Ce résultat suggère que soit GadE dimérise, soit plusieurs protéines GadE se fixent sur le promoteur de *gadA* lorsque GadE est présent en forte concentration. La bande intermédiaire disparaît à 400 ng et 800 ng, indiquant que GadE est alors en condition saturante pour sa fixation sur le promoteur de *gadA*.

Nous avons ensuite regardé la fixation de GadE sur les opérons LEE1, LEE4 et LEE5.

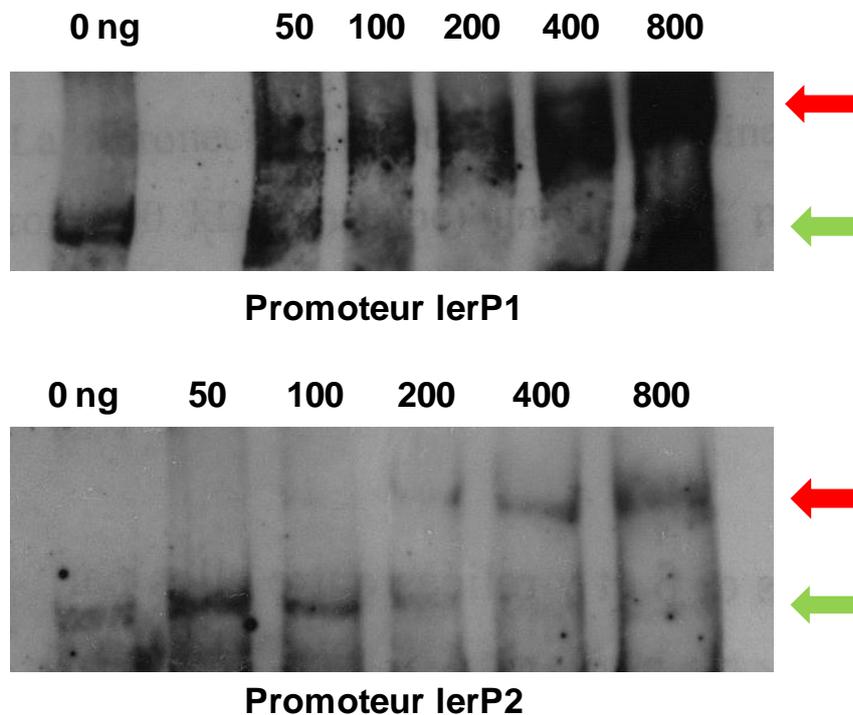


Figure 40 : Retard sur gel de polyacrylamide des deux régions promotrices de *ler* : P1 (distal) et P2 (proximal) sans protéine GadE ou avec différentes quantités : 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800ng.

En ce qui concerne le LEE1, nous pouvons voir sur la **Figure 40** que GadE se fixe sur les deux promoteurs lerP1 et lerP2. Il semble que l'affinité de GadE pour le promoteur lerP1 soit plus élevée que pour le promoteur lerP2, car on observe un retard de lerP1 à partir de 50ng de protéine alors qu'il faut 200ng de protéine pour observer un retard du promoteur lerP2.

La **Figure 41** montre que GadE se fixe également sur le promoteur de *espA* (LEE4).

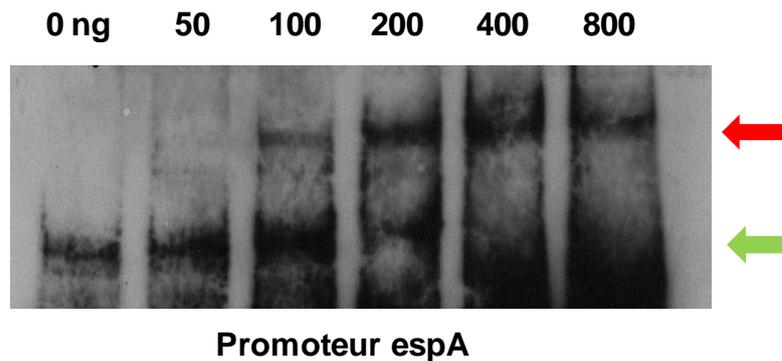


Figure 41 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de *espA* sans protéine GadE ou avec différentes quantités 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800ng.

Enfin, GadE se fixe sur les trois régions du promoteur de *tir* (LEE5), bien que les retards soient moins nets que pour les promoteurs précédents et que le fragment libre soit encore présent aux plus fortes concentrations de GadE (**Figure 42**).

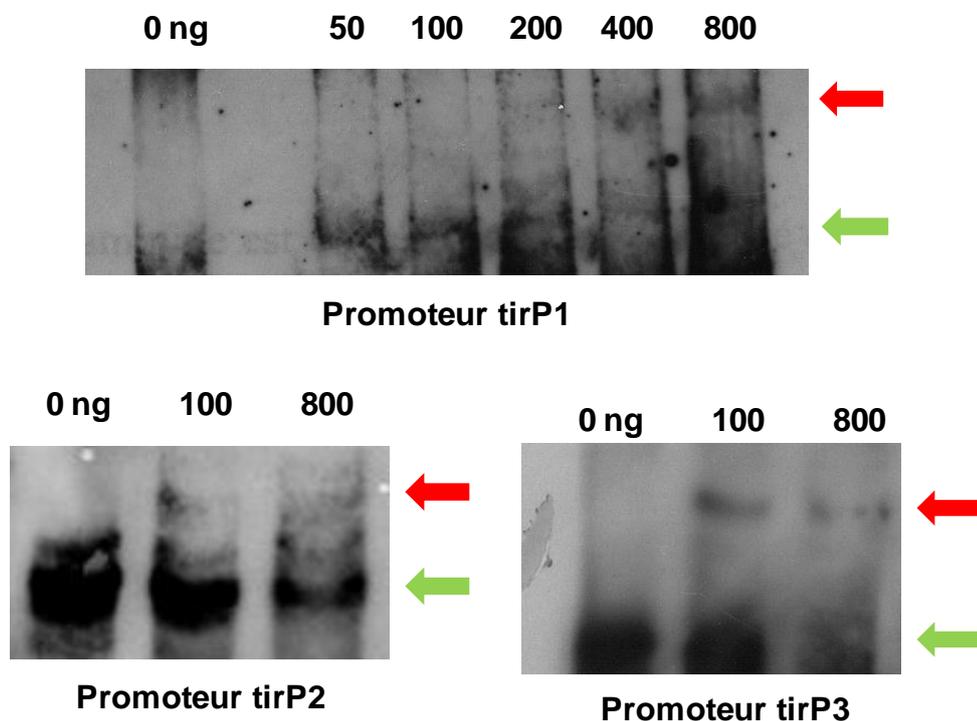


Figure 42 : Retard sur gel de polyacrylamide des régions promotrices tirP1, tirP2 et tirP3 sans protéine GadE ou avec différentes quantités 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800ng.

En conclusion, les retards sur gel montrent que GadE se fixe sur les différentes régions promotrices de *gadA*, *ler*, *espA* et *tir*. Cependant, les retards sur gel sont des expériences *in vitro* et ne reflètent pas forcément ce qu'il se passe à l'intérieur des bactéries, lorsque les autres régulateurs sont présents. Nous avons donc étudié l'interaction *in vivo* de GadE sur les promoteurs *gadX*, LEE1, LEE4, LEE5 ainsi que sur son propre promoteur. Pour cela, nous

avons effectué des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, dans les mêmes conditions de culture que pour les qRT-PCR.

Nous avons analysé l'enrichissement des régions promotrices de *gadA*, *gadE* et *gadX*. Nous avons analysé la fixation de GadE sur le promoteur de *gadA*, afin de vérifier la fixation de GadE sur le promoteur de *gadA* dans nos conditions de culture. Nous avons analysé la fixation de GadE sur les différents promoteurs de *gadE* et sur le promoteur de *gadX* afin de voir d'une part si GadE s'autorégule dans nos conditions de culture, et d'autre part si l'activation exercée sur l'expression de *gadX* est directe ou nécessite un régulateur intermédiaire. Comme cela est détaillé dans le « Matériels et Méthodes », seules les valeurs supérieures à 20 représentent une fixation de la protéine sur le promoteur considéré.

Dans nos conditions de culture, GadE se fixe sur le promoteur de *gadA*, ne s'autorégule pas et n'active pas directement l'expression de *gadX* (**Figure 43**).

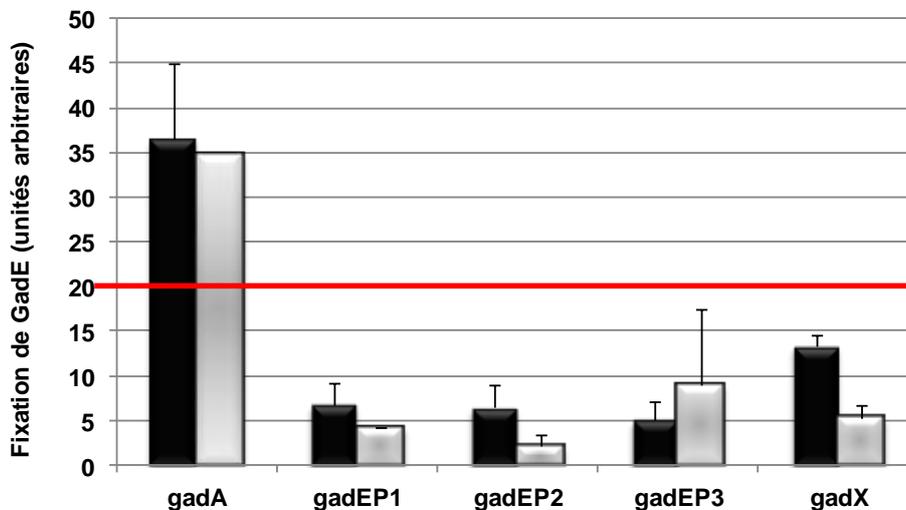


Figure 43 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de *gadX* et *gadE* immunoprécipitées avec GadE étiqueté poly-histidine, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

Nous avons ensuite analysé la fixation de GadE sur les différents promoteurs du LEE (**Figure 44**).

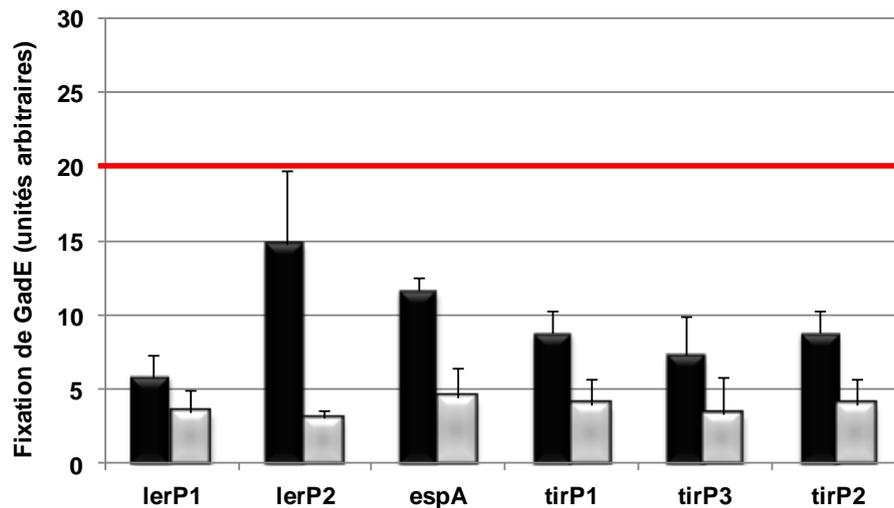


Figure 44 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec GadE étiqueté poly-histidine, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

GadE ne se fixe sur aucun des promoteurs du LEE, que ce soit en absence ou en présence de NO (**Figure 44**). La répression du LEE par GadE est donc indirecte.

Rôle de GadE dans la sécrétion des protéines effectrices

Nous avons effectué des western-blot sur les surnageants des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta gadE$ en absence ou en présence de Nor-4, afin de voir si l'activation de l'expression des gènes du LEE4 et du LEE5 observée dans le mutant $\Delta gadE$ correspond à une augmentation de la sécrétion des protéines correspondantes (**Figure 45**).

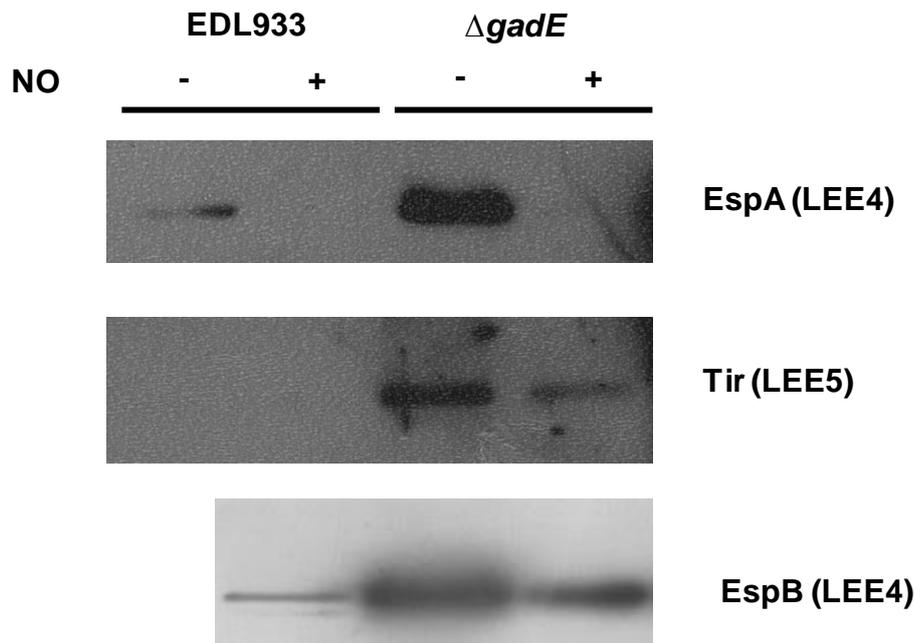


Figure 45 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta gadE$ en absence ou en présence de Nor-4.

La sécrétion de EspA est inhibée en présence de NO dans la souche sauvage (**Figure 45**). En revanche, aucune protéine Tir n'est détectée que ce soit en absence ou en présence de NO. Nous avons vu que le gène *tir* est très faiblement exprimé aussi bien en absence qu'en présence de NO (**Figure 31**). Tir est donc probablement sécrété en trop faible quantité pour être détectée dans le surnageant de culture. On observe une augmentation de la sécrétion de EspA, EspB et Tir dans le mutant $\Delta gadE$ en absence de NO, qui est inhibée en présence de NO. Ces résultats sont en accord avec les résultats de qRT-PCR qui montraient que GadE réprime l'expression du LEE4 et du LEE5 mais qu'il n'est pas impliqué dans la répression du LEE par le NO (**Figure 37**).

En conclusion, GadE active l'expression de *gadX* et réprime celle des différents opérons du LEE. GadE se fixe *in vitro* sur les différentes régions promotrices du LEE. Cette fixation n'est pas retrouvée *in vivo*. Il y a donc probablement un régulateur dans la bactérie qui empêche la fixation GadE sur les promoteurs du LEE. De plus, GadE ne se fixe pas sur le promoteur de *gadX*. Les régulations exercées par GadE sur l'expression de *gadX* et du LEE sont donc indirectes.

6. Rôle du régulateur GadX dans la régulation de l'expression du LEE et de *gadE* par le NO

Analyse transcriptionnelle

Le rôle de GadX dans la régulation du LEE chez les EHEC n'a pas été décrit à ce jour. Cependant, chez les EPEC GadX réprime l'expression du LEE *via* PerC. PerC est un homologue

des protéines régulatrices Pch chez les EHEC et active l'expression de *ler*. De plus, l'expression de nombreux gènes est régulée par GadE et GadX chez *E. coli* K-12. Nous avons donc regardé le rôle de GadX dans la régulation de l'expression de *gadE* et du LEE dans nos conditions de culture en absence et en présence de NO. Pour cela, nous avons étudié l'expression des différents gènes par qRT-PCR sur les ADNc de la souche sauvage, du mutant $\Delta gadX$ et du mutant $\Delta gadX$ complémenté (Figure 46).

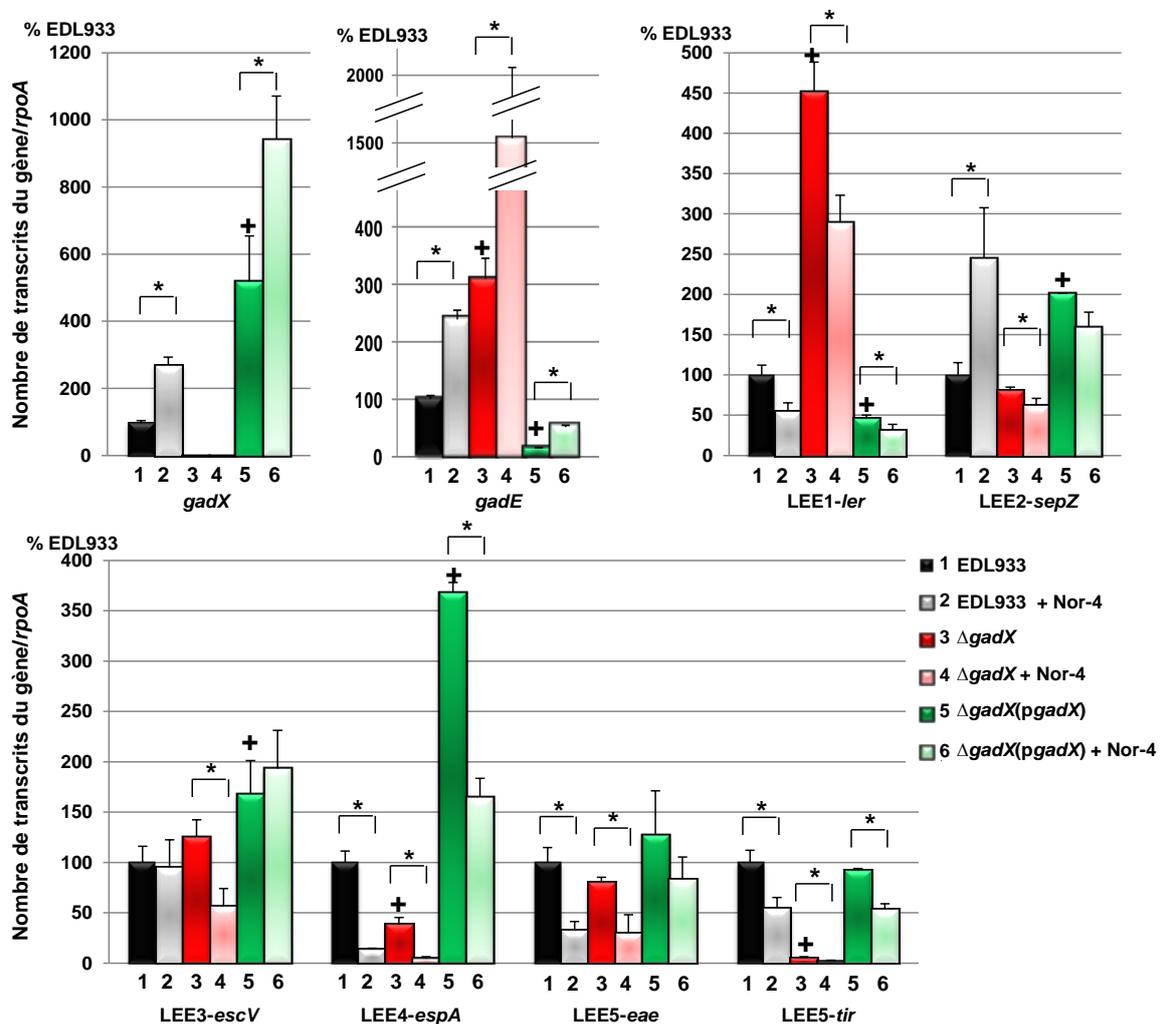


Figure 46 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE dans le mutant $\Delta gadX$ et le mutant $\Delta gadX$ complémenté par *pgadX* en absence ou en présence de Nor-4. Test *t* de Student : + : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la souche sauvage sans NO ; * : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la même souche sans NO (n=3).

Le gène *gadX* est surexprimé 5 fois dans le mutant $\Delta gadX$ complémenté comparativement à la souche sauvage (Figure 46). De façon étonnante, nous pouvons voir que l'expression de *gadX* est activée en présence de NO dans le mutant complémenté alors qu'elle est sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose, et que les cultures sont faites en présence de ce sucre. Ceci

pourrait être dû à une régulation post-transcriptionnelle NO-dépendante stabilisant les ARN messagers de *gadX*. Ce phénomène n'a pas été observé pour *gadE* (**Figure 37**).

GadX réprime l'expression de *gadE*, mais n'est pas impliqué dans l'activation de l'expression de *gadE* en présence de NO.

Concernant l'expression du LEE, GadX joue un rôle différent en fonction de l'opéron étudié. Il réprime l'expression de *ler*, et n'est pas impliqué dans la répression de *ler* par le NO. En revanche, GadX active l'expression des autres opérons du LEE mais, comme pour *ler*, n'est pas impliqué dans la répression exercée par le NO. En conclusion, GadX réprime l'expression de *gadE* et de *ler*, mais active l'expression des autres opérons du LEE. Il n'est pas nécessaire à la régulation exercée par le NO sur l'expression de ces gènes.

Analyse fonctionnelle

De la même façon que GadE, la protéine GadX étiquetée 6-histidines a été produite puis purifiée à l'aide des résines Talon et probond disponibles au laboratoire. Après la purification de la protéine GadX produite par les bactéries, un western-blot a été effectué afin de vérifier la présence de la protéine GadX-6His (**Figure 47**).

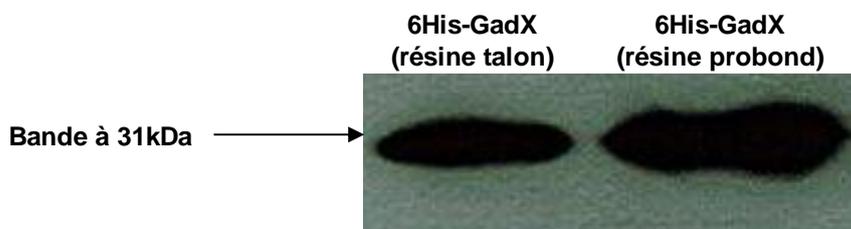


Figure 47 : Western-blot effectué sur les produits de purification de la protéine 6His-GadX avec les deux résines disponibles au laboratoire: résine Talon et résine probond.

Les bandes obtenues pour chaque échantillon correspondent à la migration d'une protéine de masse moléculaire de 31 kDa, identique à celle de GadX (**Figure 47**). La purification est plus efficace avec la résine probond qu'avec la résine Talon. Nous avons donc utilisé l'extrait protéique purifié avec la résine probond pour la suite des expériences.

Tout comme GadE, GadX est connu pour se fixer *in vitro* sur le promoteur de *gadA* (Ma *et al.*, 2003). De la même façon que pour GadE, nous avons analysé la fixation de GadX sur le promoteur de *gadA* comme contrôle positif, afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine purifiée (**Figure 48**).

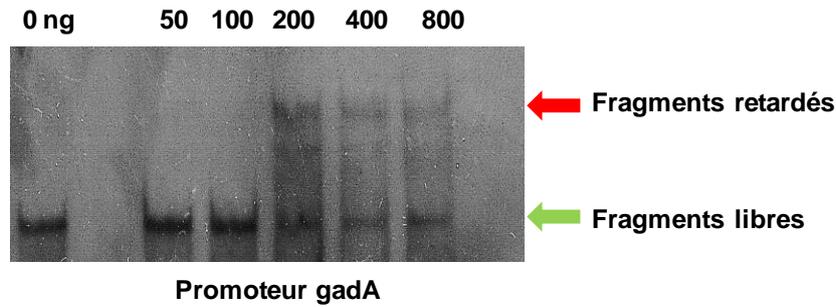


Figure 48 : Retard sur gel de polyacrylamide de la région promotrice de *gadA* sans protéine GadX ou avec différentes quantités 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 800ng.

La **Figure 48** montre qu'à partir de 200 ng de protéine GadX, le fragment promoteur de *gadA* est retardé. La protéine GadX étiquetée 6 histidine est donc fonctionnelle et se fixe sur le promoteur de *gadA*.

Nous avons ensuite regardé la fixation de GadX sur les promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5 (**Figure 49**).

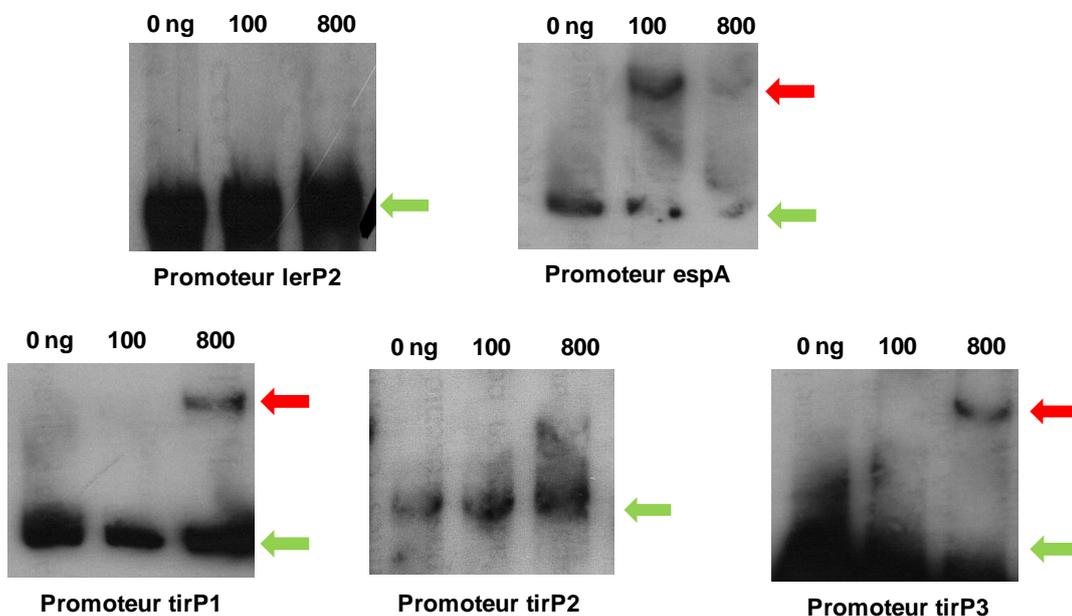


Figure 49 : Retard sur gel de polyacrylamide des régions promotrices lerP2, espA, tirP1, tirP2 et tirP3 sans protéine GadX ou avec 100 ou 800ng. La fixation de GadX sur le promoteur lerP1 n'est pas présentée car le film auto radiographique du retard sur gel n'était pas lisible.

La **Figure 49** montre que GadX ne se fixe pas sur le promoteur lerP2, et probablement pas sur la région 2 du promoteur de *tir*. En revanche, on observe un retard du promoteur de *espA* à partir de 100 ng de protéine GadX et un retard des régions 1 et 3 du promoteur de *tir* à partir de 800 ng de protéine GadX. En conclusion, GadX se fixe *in vitro* sur le promoteur du LEE4 et du LEE5 (régions 1 et 3), mais pas sur le promoteur du LEE1. Cependant, ces interactions nécessitent d'être confirmées *in vivo*, en présence de tous les autres régulateurs présents dans la

cellule, afin de voir si GadX régule directement l'expression des différents promoteurs du LEE. Pour cela, nous avons effectué des immunoprécipitations de la chromatine dans le mutant $\Delta gadX$ complémenté par le plasmide codant pour la protéine GadX étiquetée 6-histidines. Nous avons tout d'abord analysé la fixation de GadX sur les promoteurs de *gadA* et de *gadE* (**Figure 50**).

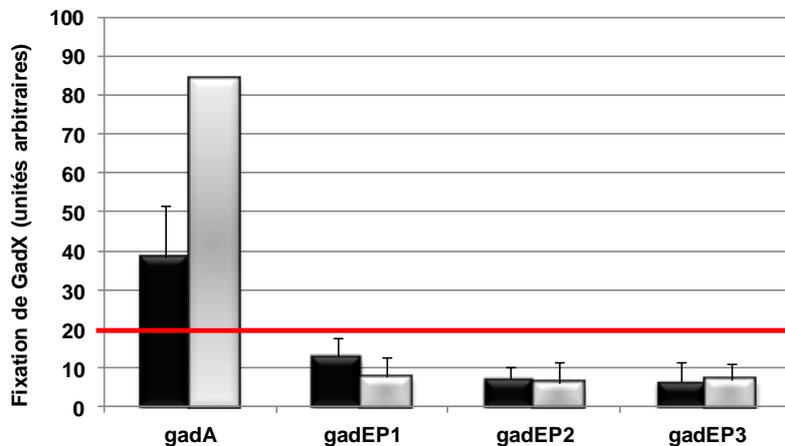


Figure 50 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de *gadA* et *gadE* immunoprécipitées avec GadX étiqueté poly-histidine, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

Le taux d'enrichissement des promoteurs de *gadA* et de *gadE* immunoprécipités avec la protéine GadX présentés en **Figure 50** montrent que *in vivo* GadX se fixe sur le promoteur de *gadA* mais ne se fixe pas sur les différents promoteurs de *gadE*.

Nous avons ensuite analysé la fixation de GadX sur les différents promoteurs du LEE (**Figure 51**).

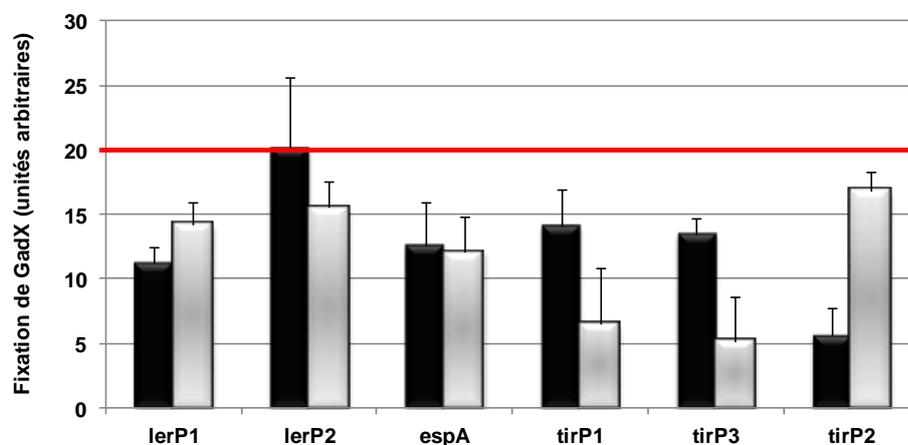


Figure 51 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4 et LEE5 immunoprécipitées avec GadX étiqueté poly-histidine, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

GadX ne se fixe pas non plus sur les différents promoteurs du LEE (**Figure 51**) Concernant le fragment promoteur lerP2, le taux d'enrichissement est de 20. L'écart-type étant élevé, nous ne considérons pas ce résultat comme positif.

Rôle de GadX dans la sécrétion des protéines effectrices

Nous avons effectué un western-blot sur les surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta gadX$ en absence ou en présence de Nor-4, afin de voir si la répression de l'expression des gènes du LEE4 dans le mutant $\Delta gadX$ est corrélée à une diminution de la sécrétion des protéines correspondantes (**Figure 52**).

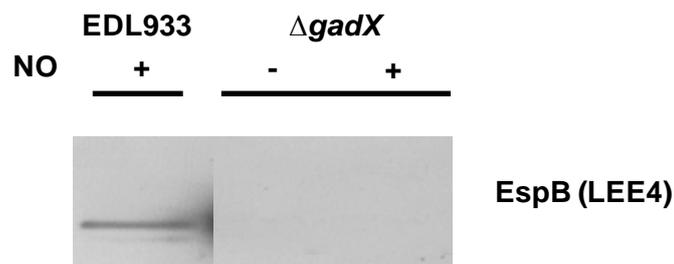


Figure 52 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta gadX$ en absence ou en présence de Nor-4.

La **Figure 52** montre que la sécrétion de EspB dans le mutant $\Delta gadX$ est inhibée en absence et en présence de NO. Ces résultats sont en accord avec les résultats de qRT-PCR qui montraient que GadX active l'expression du LEE4 (**Figure 46**).

En conclusion, GadX réprime l'expression de *gadE* et de *ler*, mais active l'expression des autres opérons du LEE. GadE réprime quant à lui tout les opérons du LEE et active l'expression de *gadX*. Nous nous sommes alors demandé si GadE et GadX répriment l'expression du LEE par la même voie de régulation ou non, et donc si l'un est épistatique à l'autre ou pas.

7. GadE et GadX sont-ils épistatiques pour la régulation de l'expression du LEE ?

Afin de voir si GadE et GadX sont épistatiques, nous avons analysé l'expression des différents gènes du LEE dans le double mutant $\Delta gadE/\Delta gadX$ (**Figure 24**).

Analyse transcriptionnelle

Dans le double mutant $\Delta gadE/\Delta gadX$ l'expression du LEE1 est identique à celle observée dans le simple mutant $\Delta gadX$. GadX est donc épistatique à GadE dans la répression de *ler*. En revanche, l'expression de *espA* et *tir* est activée de la même façon dans le double mutant que dans le mutant $\Delta gadE$. GadE est donc épistatique à GadX pour la régulation du LEE4 et du LEE5. GadE activant l'expression de *gadX* (**Figure 53**), dans le mutant $\Delta gadE$ il y a moins de transcrits de *gadX*, et donc plus de transcrits de *ler*. Par contre, GadX réprime l'expression de *gadE* (**Figure 53**). Dans un mutant $\Delta gadX$, on a donc plus de transcrits *gadE*. Cette

augmentation de la synthèse de GadE induit une répression de l'expression de *espA* et *tir* : GadX active donc indirectement l'expression de *espA* et *tir* en réprimant l'expression du répresseur GadE.

On observe une chute de l'expression du LEE2, du LEE3 et de *eae* dans le double mutant $\Delta gadE/\Delta gadX$. Cependant, l'expression observée dans le double mutant est plus faible que l'expression observée dans le mutant $\Delta gadE$ et dans le mutant $\Delta gadX$. Dans le double mutant $\Delta gadE/\Delta gadX$, il doit y avoir un autre régulateur qui réprime l'expression de LEE2, LEE3 et *eae*. Ce régulateur serait présent en plus forte quantité dans le double mutant que dans les simples mutants, ce qui suggère que GadE et GadX répriment l'expression de celui-ci indépendamment l'un de l'autre. Le gène *eae* est codé par le LEE5, tout comme *tir*, cependant leur expression n'est pas similaire puisque *tir* est activé dans le double mutant alors que *eae* est réprimé. Une hypothèse est que le régulateur contrôlé par GadE et GadX soit un régulateur de la stabilité des ARNm du LEE qui stabiliserait les ARN messagers de *tir* ou déstabiliserait ceux de *eae*.

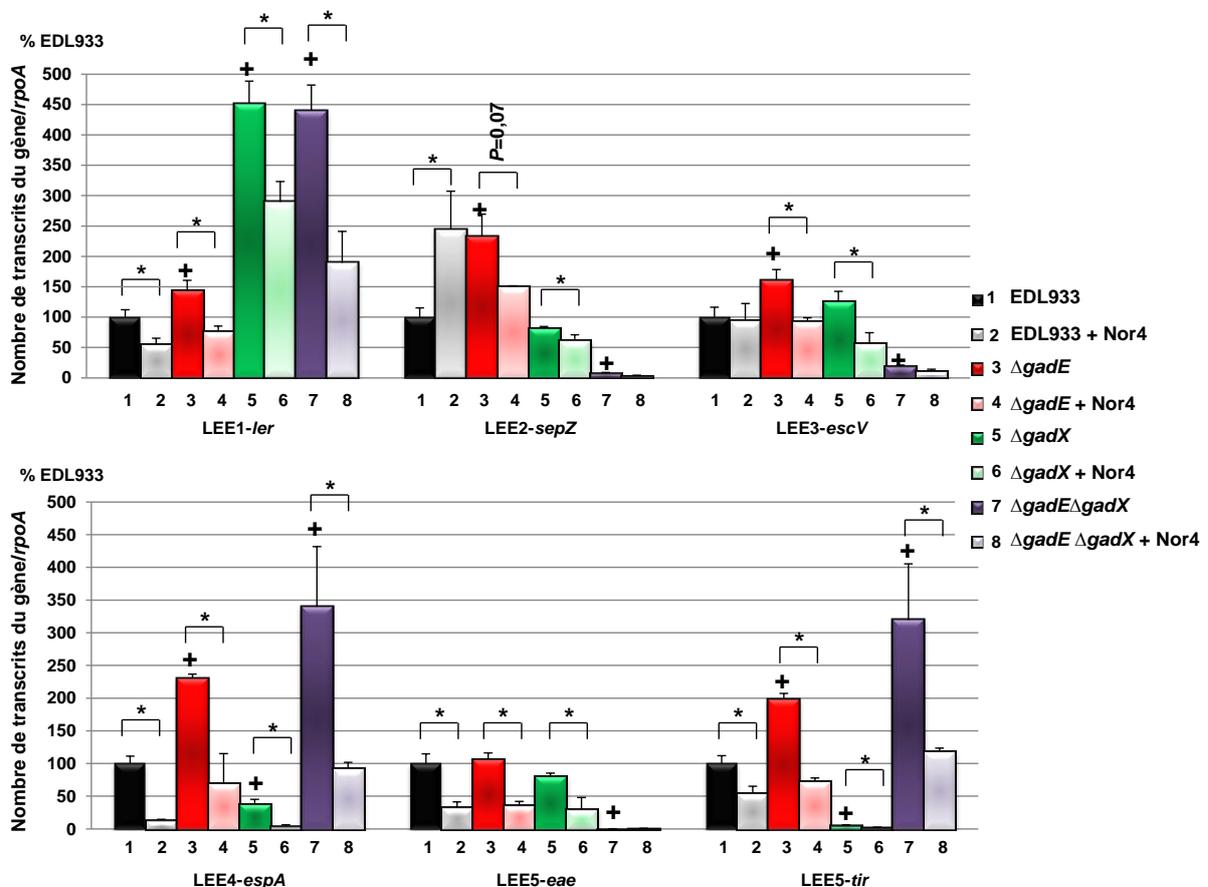


Figure 53 : Nombre de transcrits des différents gènes du LEE dans le double mutant $\Delta gadE\Delta gadX$ en absence ou en présence de Nor-4 comparativement à la souche sauvage, le mutant $\Delta gadE$ et le mutant $\Delta gadX$. Test *t* de Student : + : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la souche sauvage sans NO ; * : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la même souche sans NO (n=3).

D'autre part, la répression du LEE1, du LEE4 et du LEE5 par le NO est toujours observée dans le double mutant, comme dans les simples mutants. GadE et GadX n'agissent donc pas de concert pour la répression du LEE par le NO. Un autre régulateur est impliqué.

8. Conclusion sur la régulation du LEE, de *gadE* et de *gadX* par le NO

En conclusion, Ler, GadE et GadX sont tous les trois impliqués dans la régulation du LEE, avec des boucles de rétrocontrôle positif ou de rétrocontrôle négatif (**Figure 54**).

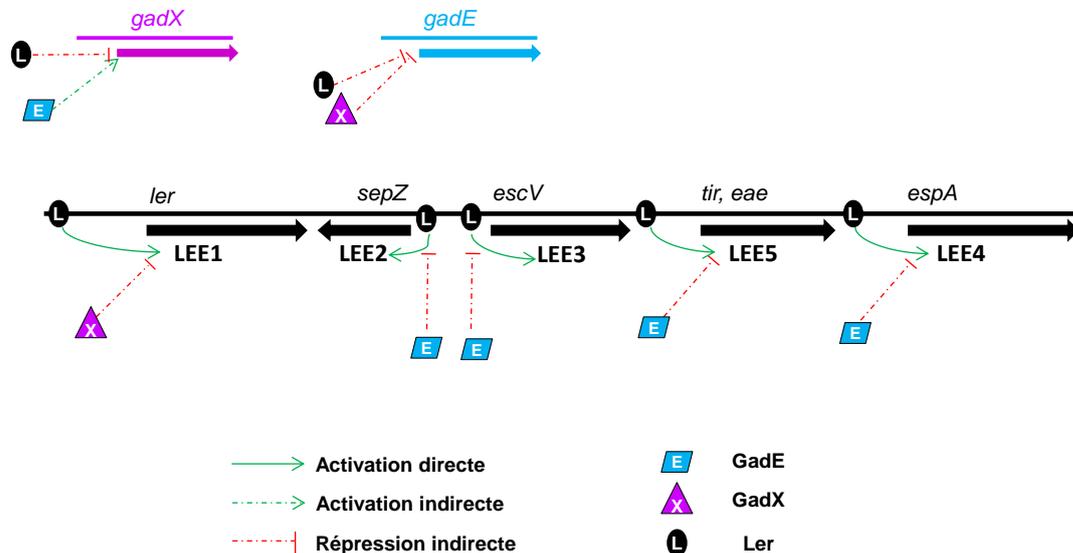


Figure 54 : Représentation schématique de la régulation du LEE par Ler, GadE et GadX.

GadE réprime l'expression de *ler* en activant l'expression de *gadX*. GadX active l'expression des opérons LEE2 à LEE5 en réprimant l'expression de *gadE*. De plus, Ler réprime l'expression de *gadE* et *gadX*. Cependant, Ler, GadE et GadX ne jouent pas un rôle majeur dans la régulation des gènes du LEE par le NO. Suite à ces observations, nous avons étudié le rôle du régulateur principal impliqué dans la réponse bactérienne au NO chez *E. coli* K-12, NsrR.

9. Rôle de NsrR dans la régulation du LEE, de *gadE* et de *gadX* par le NO

Analyse transcriptionnelle

Afin d'analyser le rôle de NsrR dans la régulation de *gadE*, *gadX* et du LEE par le NO, nous avons analysé l'expression des différents gènes dans le mutant $\Delta nsrR$ et dans le mutant $\Delta nsrR$ complémenté par un plasmide à faible nombre de copies sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (**Figure 55**). Concernant la régulation du LEE par NsrR, nous nous sommes focalisés sur la régulation de l'expression du LEE1, du LEE4 et du LEE5.

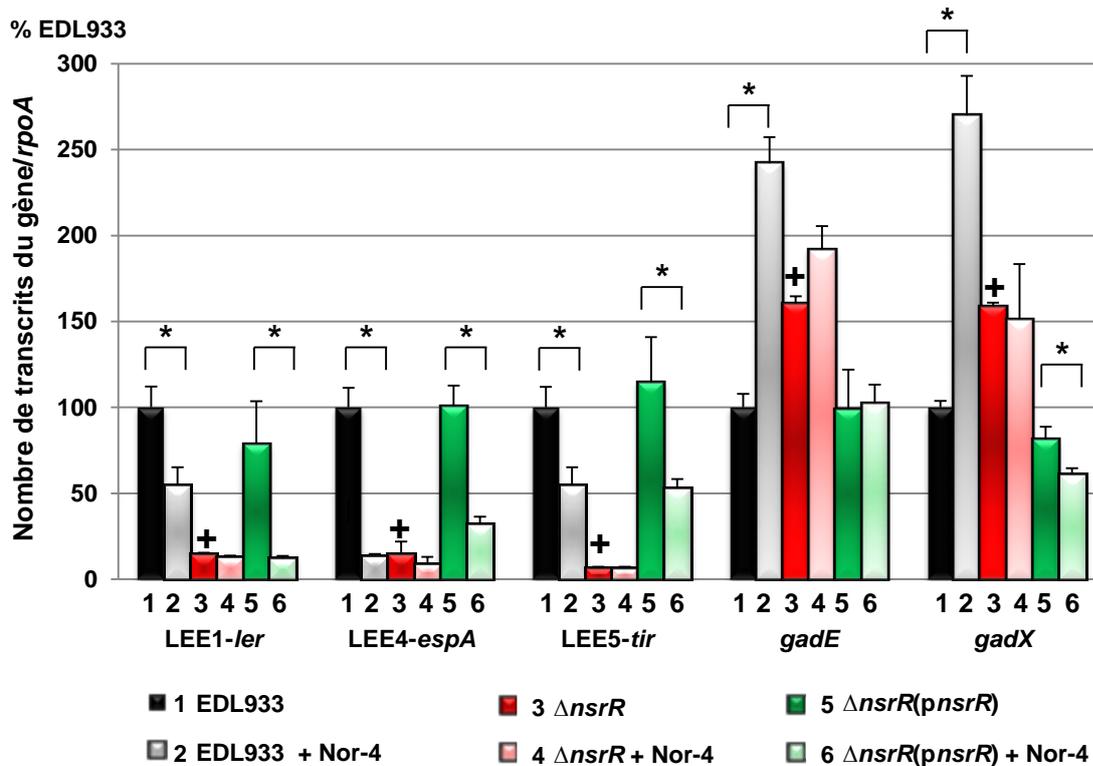


Figure 55 : Nombre de transcrits des différents gènes de l'AFI et du LEE dans le mutant $\Delta nsrR$ et le mutant $\Delta nsrR$ complémenté par *pnsrR* en absence ou en présence de Nor-4. Test *t* de Student : **+** : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la souche sauvage sans NO ; ***** : $P < 0.05$ par rapport à la valeur de la même souche sans NO (n=3).

L'expression de *nsrR* dans le mutant $\Delta nsrR$ complémenté est similaire à celle observée chez la souche sauvage (résultat non montré). La **Figure 55** montre que NsrR active l'expression du LEE1, LEE4 et LEE5. De plus, la répression par le NO est abolie dans le mutant $\Delta nsrR$, indiquant que NsrR est le régulateur clé impliqué dans la répression du LEE par le NO. L'expression du LEE est restaurée dans le mutant $\Delta nsrR$ complémenté, ainsi que la répression par le NO.

D'autre part, NsrR réprime l'expression de *gadE* et de *gadX*, et son activation par le NO n'est plus observée dans le mutant $\Delta nsrR$. NsrR est donc également le régulateur clé de l'activation par le NO de l'expression de *gadE* et *gadX*. L'expression de *gadE* et de *gadX* est restaurée dans le mutant $\Delta nsrR$ complémenté en absence de NO. Cependant, l'activation de l'expression de ces derniers par le NO n'est pas restaurée dans le mutant $\Delta nsrR$ complémenté. Notre hypothèse est la suivante : un régulateur impliqué dans l'activation de l'expression de *gadE* et *gadX* par le NO serait affecté dans le mutant $\Delta nsrR$, et la complémentation de ce dernier ne permettrait pas de rétablir la fonction du régulateur intermédiaire.

Analyse fonctionnelle

Afin de voir si NsrR active ou réprime directement l'expression du LEE, de *gadE* et de *gadX*, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, comme nous l'avons fait précédemment pour la fixation de GadE et de GadX. Nous avons amplifié les promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5 ainsi que ceux de *gadE*, *gadX*, et *hmpA*, ce dernier étant un contrôle positif car il est une cible connue de NsrR. Nous avons d'abord analysé la fixation de NsrR sur les promoteurs de *gadE*, *gadX* et *hmpA* (**Figure 56**).

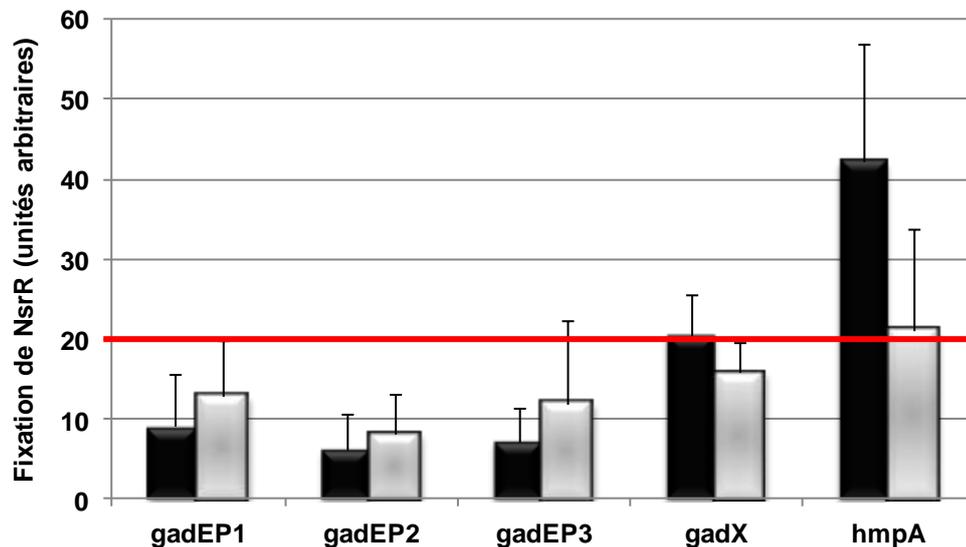


Figure 56 : Taux d'enrichissement des régions promotrices de *gadE*, *gadX* et *hmpA* immunoprécipitées avec NsrR étiqueté poly-histidine, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

Comme attendu NsrR se fixe sur le promoteur de *hmpA*, confirmant la fonctionnalité *in vivo* de la protéine NsrR étiquetée 6-histidines (**Figure 56**). Par contre, NsrR ne se fixe pas sur les promoteurs de *gadE* et *gadX*. L'action de NsrR sur l'expression de ces gènes est donc indirecte.

Ensuite, nous avons analysé la fixation de NsrR sur les différents promoteurs du LEE (**Figure 57**).

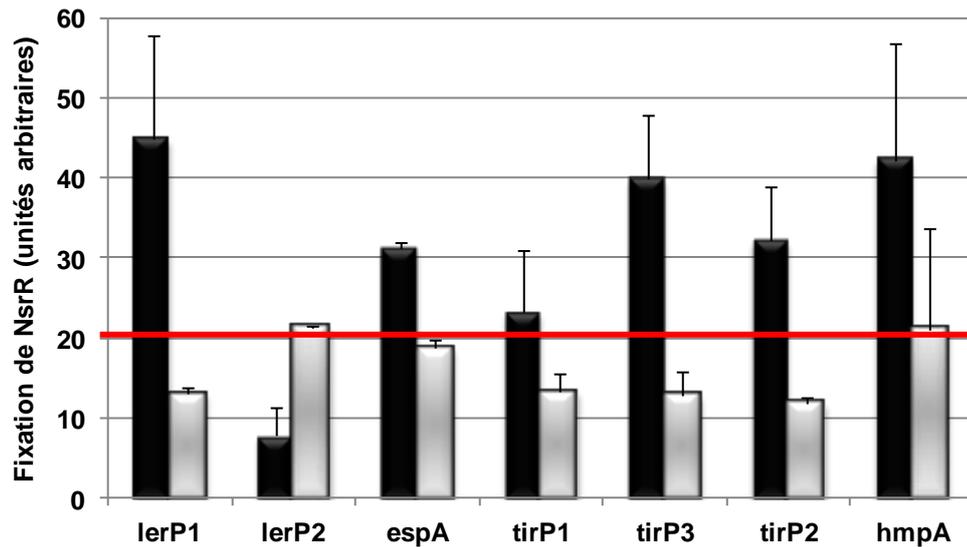


Figure 57 : Taux d'enrichissement des régions promotrices du LEE1, LEE4, LEE5 et de *hmpA* immunoprécipitées avec NsrR étiqueté poly-histidines, en absence (barres noires) ou en présence (barres grises) de Nor-4.

NsrR se fixe sur les promoteurs du LEE1, du LEE4 et du LEE5 (**Figure 57**). Plus précisément, NsrR se fixe sur lerP1, le promoteur distal de *ler*, sur le promoteur de *espA*, et majoritairement sur la région 3 du promoteur de *tir*, qui correspond à la région médiane du promoteur.

Une séquence consensus de la fixation de NsrR a été décrite chez *E. coli* K-12. Celle-ci est constituée de deux moitiés de 11 pb chacune (Tucker *et al.*, 2010b). NsrR se fixe en dimère sur la totalité de la séquence consensus, où chaque protéine NsrR se fixe sur une moitié de la séquence. Une seule protéine de NsrR peut également se fixer sur une moitié de la séquence consensus, et l'autre protéine NsrR du dimère se fixe alors de façon non spécifique à l'ADN (Tucker *et al.*, 2010b). La présence d'une seule moitié de séquence consensus est alors suffisante à la fixation de NsrR. Afin de vérifier que les différents promoteurs du LEE sur lesquels NsrR se fixe possèdent cette séquence consensus, une analyse bioinformatique a été effectuée sur les régions promotrices utilisées dans les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (**Figure 58**).

	<u>Moitié du site 11pb</u>	<u>Moitié du site 11pb</u>
Séquence du site consensus de NsrR	AAGATGCATTT	A AAATACA ACTT
	C TT AA T	G GT TTAA
		T G
LEE1- <i>ler</i>	AtCATTgATTT	T AAATGgATTTT
LEE4- <i>espA</i>	AAGtTTTATTT	T ATATGaggaTA
LEE5- <i>tir</i>	gtttTTTAaTA	T AAATGaATGTT

% d'identité avec la séquence consensus	1 ^{ère} moitié du site	2 ^{ème} moitié du site	Site entier
<i>ler</i>	81.8	90.9	86.9
<i>espA</i>	90.9	63.6	78.2
<i>tir</i>	54.5	90.9	73.9

Figure 58 : Alignement de la séquence consensus de fixation de NsrR avec les séquences promotrices de LEE1, LEE4 et LEE5. En vert sont représentés les nucléotides correspondant à la séquence consensus, en rouge ceux qui ne correspondent pas à la séquence consensus. Le tableau représente les pourcentages d'identité des séquences consensus retrouvées dans les régions promotrices de LEE1, LEE4 et LEE5 avec la séquence consensus de NsrR décrite.

La **Figure 58** montre qu'il y a des séquences consensus de fixation de NsrR dans les promoteurs du LEE1 (correspondant à la région P1), du LEE4 et du LEE5 (correspondant à la région P3). La séquence consensus complète est présente dans *ler*P1, ce qui correspond aux résultats d'immunoprécipitation de la chromatine. Les régions promotrices *espA* et *tir*P3 possèdent quant à elles une moitié de la séquence consensus, suggérant qu'une seule protéine NsrR se fixe à chacun de ces promoteurs. La région *tir*P3 correspond à la région du promoteur *tir* qui présente le taux d'enrichissement le plus élevé dans les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (**Figure 57**).

En accord avec l'absence de fixation de NsrR sur les régions promotrices de *gadE* et de *gadX*, la recherche de la séquence consensus de fixation de NsrR sur ces fragments d'ADN s'est avérée négative.

Rôle de NsrR dans la sécrétion des protéines effectrices

Nous avons effectué un western-blot sur les surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta nsrR$ en absence ou en présence de Nor-4, afin de voir si la répression de l'expression des gènes du LEE4 observée dans le mutant $\Delta nsrR$ est corrélée à une diminution de la sécrétion des protéines correspondantes (**Figure 59**).

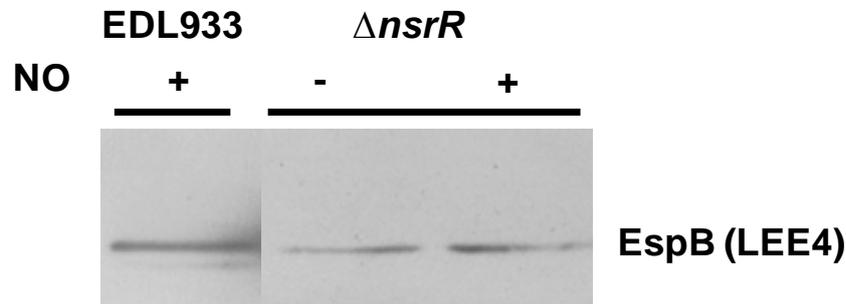


Figure 59 : Western-blot des échantillons protéiques issus des surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta nsrR$ en absence ou en présence de Nor-4.

La **Figure 59** montre que la sécrétion de EspB est inhibée dans le mutant $\Delta nsrR$ et qu'il n'y a plus de répression de la sécrétion par le NO. Ces résultats sont en accord avec les résultats de qRT-PCR qui montraient que NsrR active l'expression du LEE4 et qu'il n'y a plus de répression par le NO dans le mutant $\Delta nsrR$.

10. Modèle de régulation du LEE

En l'absence de NO NsrR réprime indirectement l'expression de *gadE* et de *gadX*, et active directement l'expression du LEE1, LEE4 et LEE5 en se fixant probablement sur les séquences consensus potentielles de NsrR présentes dans les promoteurs de ces derniers (**Figure 60**). Les analyses bioinformatiques montrent que le site consensus entier est relativement bien conservé dans le promoteur du LEE1, suggérant qu'un dimère de NsrR se fixe sur cette région. En revanche, les promoteurs du LEE4 et du LEE5 ne possèdent qu'une moitié de site relativement bien conservée, suggérant qu'une seule protéine NsrR se fixe spécifiquement sur ces régions. NsrR agissant en dimère, l'autre protéine aurait une fixation aspécifique. Des analyses complémentaires sont nécessaires concernant la régulation de l'expression du LEE2 et du LEE3 par NsrR.

Régulation de l'expression du LEE en absence de NO

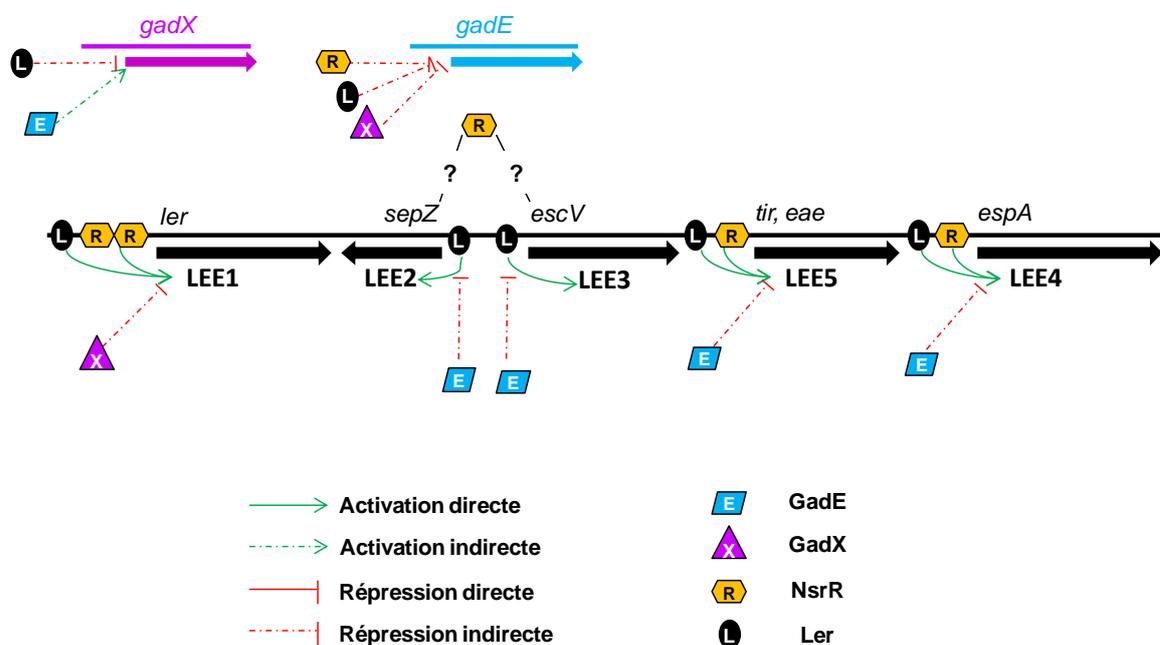


Figure 60 : Modèle de régulation du LEE par Ler, GadE, GadX et NsrR en absence de NO.

En présence de NO, ce dernier se fixe sur NsrR, qui change alors de conformation et se détache de ses cibles ADN (**Figure 61**). Ainsi il ne régule plus l'expression ou l'activité de l'intermédiaire qui l'active l'expression de *gadE* et de *gadX*, et il n'active plus lui-même l'expression des opérons LEE1, LEE4 et LEE5. On observe alors une répression de l'expression du LEE1, LEE4 et LEE5 en présence de NO, due à la fois à l'augmentation de GadE et à l'absence de fixation de NsrR.

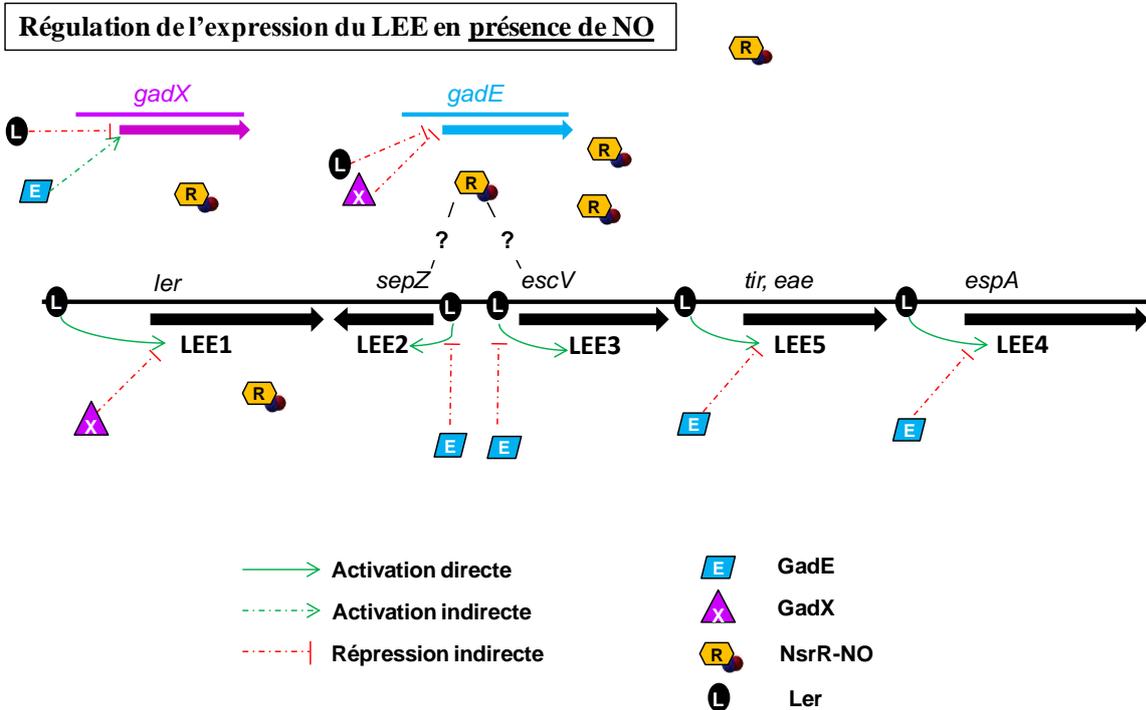


Figure 61 : Modèle de régulation du LEE par Ler, GadE, GadX et NsrR en présence de NO.

Discussion et perspectives

La résistance à l'acidité et l'adhésion aux cellules intestinales sont deux facteurs importants dans la physiopathologie des infections à EHEC, notamment de sérotype O157:H7. L'importance de la mise en place de ces processus uniquement dans le compartiment physiologique où ils sont requis implique que les EHEC ont établi des mécanismes de régulation inversement coordonnée pour la résistance à l'acidité codée par l'AFI et l'adhésion intestinale codée principalement par le LEE. Plusieurs études ont montré que l'activateur principal de l'AFI, GadE, réprime l'expression des gènes du LEE (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009; Tatsuno *et al.*, 2003; Tree *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu n'ont pas été décrits. D'autre part, le système immunitaire de l'Homme a mis en place des stratégies pour lutter contre les infections. Parmi ces stratégies, la réponse immune innée, qui est la première défense lors d'une infection microbienne, se caractérise notamment par la synthèse de NO, un agent antimicrobien.

Le NO endogène, produit par les cellules épithéliales intestinales, aussi bien qu'exogène, apporté par un donneur de NO, inhibe l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales (Vareille, 2008). L'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales est majoritairement due au SSTT et aux protéines qu'il sécrète, codés par le LEE (Garmendia *et al.*, 2005). Notre étude a permis de préciser la cascade de régulation du LEE par GadE et GadX chez la souche EHEC O157:H7 EDL933. De plus, nous avons montré que NsrR, qui est le régulateur principal impliqué dans la réponse d'*E. coli* K-12 au NO, est la protéine clé de la répression du LEE par le NO. Nous proposons ainsi un modèle de régulation du LEE dans lequel NsrR réprime l'expression des opérons du LEE par deux voies, l'une directe, et l'autre indirecte en activant l'expression de *gadE* et de *gadX*.

Ler est l'activateur principal des autres opérons du LEE (Elliott *et al.*, 2000 ; Hacker & Kaper, 2000 ; Mellies *et al.*, 1999 ; Sperandio *et al.*, 2002). Mais notre étude a montré que lorsqu'il est surexprimé, il réprime au contraire leur expression. Le SSTT est ancré dans la membrane bactérienne. Il est donc probable qu'une synthèse trop importante de celui-ci engendre une perturbation de la membrane et mette en jeu la survie bactérienne. Notre hypothèse est qu'il existe des régulations encore inconnues à ce jour qui viennent contrebalancer l'activation des différents opérons du LEE lorsque Ler est présent en concentration trop importante.

Chez la souche EHEC O157:H7 Sakai, Ler et PchA répriment l'expression de *gadE* et *gadX* en se fixant sur leurs promoteurs respectifs (Abe *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes de régulation ne sont pas connus, à savoir si Ler et PchA agissent indépendamment l'un de l'autre, ou s'ils ont besoin l'un de l'autre pour se fixer sur le promoteur de *gadE* et *gadX*. Notre étude a montré que chez la souche EDL933 Ler réprime aussi l'expression de *gadE* et de *gadX* mais ne se fixe pas sur leurs promoteurs respectifs. Cette répression par Ler est donc indirecte chez EDL933. Chez la souche EDL933, il existe des homologues aux gènes *pchCDE*, mais pas d'homologue à *pchA* et *pchB*. On peut donc supposer la présence d'un autre régulateur dans la souche EDL933, dont l'expression serait régulée par Ler, qui n'agirait pas en dimère avec ce dernier mais plutôt en aval dans la cascade de régulation.

La voie par laquelle GadE réprime l'expression du LEE est controversée. En effet, alors que les travaux de Tatsuno *et al.* et Tree *et al.* indiquent que GadE réprime directement l'expression du LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 indépendamment de Ler (Tatsuno *et al.*, 2003 ; Tree *et al.*, 2011), l'étude de Kailasan-Vanaja *et al.* a montré que la répression du LEE par GadE fait intervenir Ler (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Ces divergences peuvent résulter de différences de conditions de culture et de techniques utilisées. Cependant, les mécanismes moléculaires n'ont pas été étudiés *in vivo*. Notre étude montre que GadE réprime l'expression des opérons du LEE par les deux voies, l'une Ler-dépendante et l'autre Ler-indépendante. En effet, l'expression des gènes *sepZ*, *escV*, *espA* et *eae* est fortement réprimée lorsque *gadE* est surexprimé, alors que l'expression de *ler* est peu modifiée. Ceci suggère que la répression du LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 par GadE est indépendante de Ler. Cependant, la voie de répression du LEE par GadE *via* Ler est également présente puisque GadE réprime l'expression de *ler*. Nos résultats montrent que GadE se fixe *in vitro* sur les promoteurs de *ler*, du LEE4 et du LEE5, rejoignant les résultats de Tree *et al.* concernant la fixation de GadE sur le promoteur de *ler*. Cependant, GadE ne se fixe pas *in vivo* sur les promoteurs de *ler*, du LEE4 et du LEE5, suggérant que la fixation de GadE sur les promoteurs de *ler*, du LEE4 et du LEE5 est aspécifique *in vitro*, ou qu'un autre régulateur possède une affinité plus importante pour ces différents promoteurs, empêchant alors la fixation de GadE. Nous avons montré que GadE active l'expression de GadX, et que GadX est un intermédiaire de la répression de *ler* par GadE. Cependant, GadX ne se fixe pas non plus sur le promoteur de *ler*. Il y a donc un intermédiaire encore non décrit à ce jour dans la répression de l'expression de *ler* par GadE et GadX. Chez les EPEC, il a été décrit que GadX réprime l'expression de *ler* *via* le régulateur PerC (Shin *et al.*, 2001). GadX se fixe *in vitro* sur le

promoteur de *perA*, premier gène de l'opéron *per* qui code entre autre pour PerC. Chez les EHEC, il existe des homologues de PerC, les protéines régulatrices Pch. Il est donc possible que l'intermédiaire de la répression de l'expression de *ler* par GadX soit un des régulateurs Pch présents chez les EHEC. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le rôle des différentes protéines régulatrices Pch dans la cascade de régulation de *ler* par GadE et GadX.

Nos résultats montrent qu'il existe également un intermédiaire dans la répression du LEE4 et du LEE5 par GadE. Cet intermédiaire n'est pas GadX, puisque contrairement à la répression de l'expression de *ler*, c'est cette fois-ci GadE qui est épistatique à GadX. GadX exerce une répression sur l'expression de *gadE*, ce qui explique pourquoi, en absence de *gadX*, l'expression du LEE4 et du LEE5 est réprimée. Plusieurs études ont montré que YhiF est indispensable à la répression du LEE par GadE (Tatsuno *et al.*, 2003; Tree *et al.*, 2011). YhiF est une protéine qui possède un domaine de fixation à l'ADN homologue à ceux des protéines de la famille LuxR. Des d'hybridations d'ADNc sur puces à ADN chez *E. coli* K-12 ont montré que GadE active l'expression de *yhiF* (Hommais *et al.*, 2004). Le rôle de YhiF dans la régulation des gènes n'a cependant pas encore été étudié. Nous avons donc analysé la régulation de l'expression de *yhiF* par GadE (Figure 62).

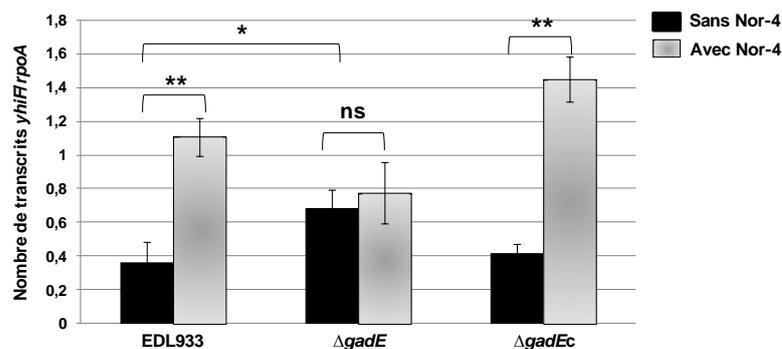


Figure 62 : Expression de *yhiF* dans la souche sauvage EDL933, dans le mutant $\Delta gadE$ et le mutant complémenté $\Delta gadE(pgadE)$ en absence ou en présence de Nor-4. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$.

Nous voyons que l'expression de *yhiF* est activée par le NO, et que cette activation nécessite GadE. Nous suggérons en conséquence que YhiF est un intermédiaire dans la voie de régulation du LEE par GadE.



Figure 63 : Modèle hypothétique de la régulation du LEE par GadE et YhiF. Flèche verte : activation ; trait rouge : inhibition directe.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier le rôle de YhiF dans la transcription du LEE. Plus précisément, la transcription du LEE dans un mutant EDL933 Δ *yhiF* ainsi que dans un double mutant EDL933 Δ *gadE* Δ *yhiF* pourrait être analysée, et si YhiF est un régulateur de l'expression du LEE, sa fixation *in vivo* sur les différents promoteurs pourrait être étudiée.

Nos résultats de qRT-PCR montrent que, dans le double mutant Δ *gadE* Δ *gadX*, l'expression du LEE2 et LEE3 est fortement réprimée, alors que celle des autres opérons est activée comparativement à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent fortement que la régulation de l'expression de LEE2 et LEE3 est différente de celle de LEE1, LEE4 et LEE5. Dans la première partie des résultats, nous avons vu que lorsque *ler* est trop exprimé (800% relativement à l'expression dans la souche sauvage), l'expression des autres opérons du LEE est réprimée, alors que quand il est exprimé de façon plus modérée (100 à 178%) il active l'expression des autres opérons du LEE. Dans le double mutant Δ *gadE* Δ *gadX*, le taux d'expression de *ler* est de 440%, ce qui correspond à un taux intermédiaire entre 178% et 800%. Ce taux intermédiaire est peut-être à la charnière entre l'expression de *ler* qui active et l'expression de *ler* qui réprime l'expression du LEE2-5. Dans cette hypothèse, Ler aurait une affinité moins importante pour les promoteurs du LEE4 et LEE5 que pour les promoteurs du LEE2 et LEE3. Ainsi, à cette concentration seuil, il activerait l'expression de LEE4 et LEE5 et réprimerait l'expression de LEE2 et LEE3. Pour vérifier cela, nous pourrions faire une gamme d'expression de *ler* avec différentes concentrations d'arabinose dans le mutant *ler* complété et analyser l'expression du LEE2-5 en conséquence. Nous pourrions également analyser le nombre de molécules Ler liées aux différents promoteurs en fonction de la quantité de protéine Ler.

D'autre part, il est surprenant d'observer une différence de nombre de transcrits de *tir* et de *eae*, puisqu'ils appartiennent tous les deux au même opéron. En effet, dans le double mutant

$\Delta gadE\Delta gadX$, on observe plus de transcrits de *tir* que dans la souche sauvage, alors que le nombre de transcrits de *eae* est quant à lui fortement diminué. Ce résultat suggère une régulation post-transcriptionnelle, et plus précisément une régulation de la stabilité des ARNm. La protéine Hfq est un candidat possible pour exercer ce contrôle post-transcriptionnel. En effet, il a été montré que Hfq réprime l'expression de tous les opérons du LEE, en réprimant l'expression de *ler* mais aussi directement, indépendamment de Ler (Hansen & Kaper, 2009; Shakhnovich *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas clairement définis. Il semble que, en phase exponentielle de croissance, Hfq déstabilise les ARNm des différents opérons du LEE de la même façon, puisque dans un mutant Δhfq l'augmentation du nombre de transcrits des différents opérons du LEE est identique. En revanche, en phase stationnaire, l'augmentation du nombre de transcrits des différents opérons du LEE n'est pas identique pour tous les opérons du LEE, suggérant que l'affinité de Hfq est différente pour les différents ARNm du LEE (Hansen & Kaper, 2009; Shakhnovich *et al.*, 2009). On peut émettre l'hypothèse que Ler exercerait un rétrocontrôle positif sur l'expression de *hfq*. Dans nos conditions de culture, la concentration de Hfq qui en résulte permettrait sa fixation sur l'ARNm de *eae* mais pas de *tir*, conduisant à la répression de la synthèse de Eae mais pas de Tir. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser l'effet de la surexpression de *ler* dans un mutant Δhfq et analyser la fixation et la localisation de Hfq sur les différents messagers des opérons du LEE.

Il peut sembler étonnant que dans le mutant *gadX* complétement le taux d'ARNm de *gadX* soit plus élevé en présence qu'en absence de NO. En effet, *gadX* est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose, insensible au NO. Cependant, nous avons observé que GadY, un petit ARN non codant qui favorise la stabilité de l'ARNm de *gadX*, est surexprimé en présence de NO. Il est donc probable que les ARNm de *gadX* soient dégradés moins rapidement en présence qu'en absence de NO, et donc présents en plus grande quantité pour un taux d'expression du gène identique.

NsrR est le régulateur clé de la réponse des *E. coli* au NO (Tucker *et al.*, 2010b), cependant son rôle dans la virulence de bactéries pathogènes n'a jamais été démontré auparavant. Nos résultats montrent que NsrR est le régulateur principal de la régulation de l'expression du LEE par le NO. De plus, nous avons montré qu'il est un activateur direct de l'expression du LEE1, LEE4 et LEE5. Ce résultat est original puisque, jusqu'à ce jour, seule une activité répressive directe avait été démontrée pour NsrR, bien qu'une activité activatrice ait été suggérée par des

analyses transcriptomiques globales (Filenko *et al.*, 2007). Il sera nécessaire par la suite d'effectuer des expériences de mutagenèse dirigée ou de protection à la DNaseI afin de préciser le site de fixation de NsrR sur les promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5.

Notre étude a permis d'élaborer un modèle de régulation du LEE chez la souche EHEC O157:H7 EDL933. Ce modèle appréhende la régulation de l'expression du LEE par les régulateurs GadE et GadX. Cependant, nous avons montré que la régulation du LEE par GadE et GadX nécessite un ou des intermédiaire(s). De plus, nous avons identifié le régulateur impliqué dans l'activation de l'expression de *gadE* et *gadX* et dans la répression du LEE par le NO : NsrR. NsrR serait donc une cible intéressante à étudier dans la recherche de thérapies contre les infections à EHEC.

**Chapitre II : rôle du di-GMPc chez la souche EHEC
O157:H7 EDL933**

Introduction

Lorsque les cellules épithéliales intestinales T84 sont infectées par la souche EDL933, elles produisent des cytokines en réponse à cette infection. Avant mon arrivée au laboratoire, une banque de mutants aléatoires par insertion d'un transposon avait été réalisée à partir de la souche EDL933. Un mutant avait été sélectionné sur son incapacité à induire la production de cytokines IL-8 et CCL-20 par les cellules T84. Le transposon avait été localisé dans le gène *z1528*, renommé *vmpA*. Ce gène n'avait jusqu'à présent jamais été étudié. Une analyse bioinformatique sur la séquence protéique avait été effectuée afin de savoir si les motifs spécifiques de certains domaines protéiques sont présents. L'alignement des séquences protéiques de VmpA avec deux PDE actives décrites suggère que le gène *vmpA* code pour une protéine à domaine EAL, caractéristique des PDE (**Figure 64**).

PdeA1	480	QGMLQLHYQ Q QVRTHHTLELSGVEAISRWHPHLGNIFPSRFI A V A EE T EQIEAIGRWSLL
VieA	148	HDHIFNYY Q QDFDRSGAMVGVEALVRYEHP T H G MLSPAV F LPL I EQ C GLHEKLF L TVLE
VmpA	299	SGEFSVHY Q QVCDTTTKAC L GV E AL M RWQ R EDGKNIS P V V E I RA A EE N LI I PL T KHL F E
		* * * * *
PdeA1	540	EACRQIVKWDRDGVHVPTVAVNLSAVHFERNRALPEHIAALLKDHNLKPAR L TV E IT E SVM
VieA	208	KSVSALASIGAD----LQLSVN I SQRN L QHS-ICDPILAI C ERYGFPASK L TE M TEHEV
VmpA	359	LIIQDVQSWKVKKP--FHLGIN I AAEHLAHPDFVADVLH I KNAISDKFN-IV L E I TERNL
		* * * * *
PdeA1	600	MDNSRDTEEV L Q S IRNIGCGLS M DDFG T CGYSSLS R L T R L P L TE I K I DR S F I NDFEYDTNA
VieA	263	YNGTPTSLANLAR L RM Y GV G LS I DDFG T CGYAS L G L AQ L P F TE L K I DR S F V HDLATNYKH
VmpA	416	VEDTDHALQKINELRSHGCEFAVDDFG T CGYCS L GL L QKLSVDY L K I DR S E I DTLTTA E DE
		* * * * * * * * * *
PdeA1	660	QAVTMAVIGIGSRLG M TVV T EGV E TEQ R DLLEKLNCDVM Q GY L FA K PL A PQDLEAWVRR
VieA	323	QQLTNMCLLL A Q S LG L H C V V EGV E NEETWQYLRQLGVD T CGY Y AA K MP I AQLSELYTK
VmpA	476	TPVLDII I KLSNRLN L IT I AE G V S T S HQAEYLIHNNV T LV Q GY L Y A K E MP K ATEFYQWYVN
		* * * * * * * * * *

Figure 64 : Alignement de la séquence protéique de VmpA avec les phosphodiesterases fonctionnelles PdeA1 de l'espèce *Gluconacetobacter xylinus* et VieA de *Vibrio cholerae*. Les résidus identiques dans plus de 80% des domaines EAL actifs sont surlignés en noir, les résidus conservés dans 100% des domaines EAL actifs sont indiqués par des astérisques, et les résidus similaires présents dans 100% des domaines EAL actifs sont surlignés en gris.

L'organisation génomique de la souche *E. coli* K-12 MG1655 et de la souche EHEC EDL933 ont été comparée (Figure 2). Le gène *vmpA* est absent de la souche MG1655 alors qu'il est présent chez EDL933 dans l'îlot OI-47 spécifique des EHEC O157:H7. Des expériences d'hybridation sur colonies ont montré que le gène *vmpA* est présent chez toutes les espèces d'EHEC O157:H7 testées au laboratoire (résultats non montrés). Il est important de noter que le gène *vmpA* est situé juste en aval du gène *ycdT* codant pour une DGC fonctionnelle.

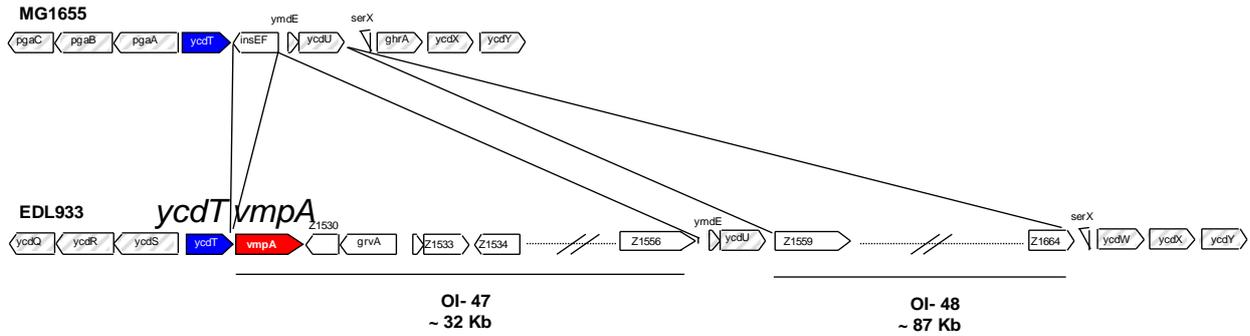


Figure 65 : Comparaison de l'organisation génomique de la souche *E. coli* K-12 MG1655 et de la souche EHEC EDL933, avec en bleu le gène *ycdT* et en rouge le gène *vmpA*.

Un mutant isogénique avait été construit en remplaçant le gène *vmpA* par une cassette de résistance à la kanamycine. Une analyse transcriptomique du mutant $\Delta vmpA::km$ avait été effectuée afin de voir l'impact du di-GMPc sur l'expression des gènes des EHEC. Elle indiquait que VmpA réprime l'expression de l'AFI et active l'expression du LEE (Figure 66).

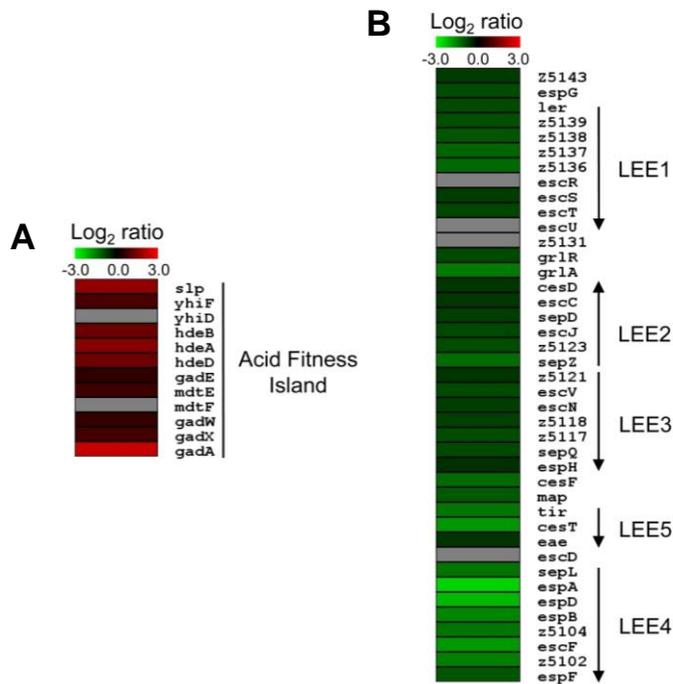


Figure 66 : Résultats de l'analyse transcriptomique effectuée dans le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$ comparé à la souche sauvage EDL933. En rouge : répression de l'expression des gènes dans le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$; en vert : activation de l'expression des gènes dans le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$. A- résultats sur l'expression de l'AFI. B- résultats sur l'expression du LEE.

Les objectifs de mon travail étaient d'une part de caractériser la protéine VmpA, à savoir si elle est une PDE fonctionnelle impliquée dans divers processus physiologiques tels que la mobilité, la formation de biofilm et l'adhésion. D'autre part, nous souhaitions caractériser la cascade de régulation du LEE par le di-GMPc. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que GadE et GadX sont des régulateurs de l'expression du LEE. Nous nous sommes alors demandé s'ils étaient les intermédiaires de la régulation du LEE par le di-GMPc. Si tel était le cas, le dernier objectif était de savoir si la modulation de l'expression du LEE par le di-GMPc et le NO sont liées. Nous souhaitions également analyser les différences de régulation de l'expression du LEE par le di-GMPc à pH acide (retrouvé dans l'estomac) et à pH neutre (retrouvé dans l'intestin), afin de connaître le rôle du di-GMPc dans la régulation inversement coordonnée du LEE et de *gadE* et *gadX*.

Matériels et Méthodes

Souches et plasmides utilisés

Les souches utilisées lors de mes travaux sont référencées dans le (**Tableau 12**). La souche EHEC O157:H7 utilisée est la souche EDL933, isolée à partir de viande de bœuf lors de l'épidémie qui a eu lieu aux USA en 1982.

Tableau 12 : Souches et plasmides utilisés pour l'étude.

Souches et plasmides	Caractéristiques	Reference
Souches		
EDL933	Souche sauvage EHEC O157:H7	(O'Brien <i>et al.</i> , 1983)
$\Delta vmpA ::km$	EDL933 $\Delta vmpA ::km$; Kmr	Unité de microbiologie, INRA Theix
$\Delta vmpA ::cat$	EDL933 $\Delta vmpA ::cat$; Camr	Ce travail
$\Delta gadE$	EDL933 $\Delta gadE ::cat$; Camr	Unité de microbiologie, INRA Theix
$\Delta vmpA \Delta gadE$	EDL933 $\Delta vmpA ::km \Delta gadE ::cat$; Kmr, Camr	Unité de microbiologie, INRA Theix
$\Delta gadX$	EDL933 $\Delta gadX ::cat$; CamR	Ce travail
Δler	EDL933 $\Delta ler ::km$; KanR	Ce travail
115B5	EDL933	Unité de microbiologie, INRA Theix
$\Delta vmpA ::vmpA-cat$	Complémentation en <i>cis</i> du mutant EDL933 $\Delta vmpA ::km$; Camr	Ce travail
$\Delta vmpA ::vmpA-km$	Complémentation en <i>cis</i> du mutant EDL933 $\Delta vmpA ::cat$; Kmr	Ce travail
$\Delta ycdT ::km$	EDL933 $\Delta ycdT ::km$; Kmr	Ce travail
Plasmides		
pBAD33	Promoteur inductible à l'arabinose ; Cmr	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD30	Promoteur inductible à l'arabinose ; Ampr	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
p33vmpA	Promoteur inductible à l'arabinose ; Cmr	Ce travail
p30vmpA	Promoteur inductible à l'arabinose ; Ampr	Ce travail
pKO3	Plasmide suicide ; Cmr	(Link <i>et al.</i> , 1997)
pKO3'ycdT-vmpA	Plasmide suicide ; Cmr	Ce travail
pyahA	Promoteur inductible à l'IPTG ; Ampr	(Schmidt <i>et al.</i> , 2005)
p30ycdT	Promoteur inductible à l'arabinose ; Ampr	Ce travail

Construction des différents mutants

Les mutants isogéniques ont été obtenus par la méthode de Datsenko et Wanner décrite dans la partie « Matériels et Méthodes » du **Chapitre I** (Datsenko & Wanner, 2000).

Construction des plasmides pour les complémentations

Pour la complémentation des différents mutants, les gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR à partir d'ADNg d'EDL933 à l'aide de l'ADN polymérase haute fidélité Pfx50 (Invitrogen). Les amorces permettant l'amplification du gène et le clonage par la suite contiennent :

1. Les séquences correspondant aux débuts et aux fins des gènes à cloner
2. Les sites de restriction des enzymes utilisées pour la digestion enzymatique des fragments de PCR

Les fragments PCR sont purifiés et digérés par les enzymes de restriction puis ligués dans les différents plasmides digérés eux aussi par les mêmes enzymes de restriction. Les plasmides recombinants obtenus ainsi que leurs caractéristiques sont présentés dans le **Tableau 12**.

Milieux et conditions de culture

Les différentes souches bactériennes sont conservées en glycérol 20% à -20°C et -80°C. Les bactéries sontensemencées en milieu LB et les précultures sont cultivées à 37°C sous agitation pendant la nuit. Le lendemain, les précultures sont diluées au 1/100^{ème} dans du milieu frais et cultivées selon les conditions requises pour l'expérience, c'est-à-dire en milieu EG pH 5 ou pH 7 ou LB en présence ou non de glucose ou d'arabinose, jusqu'aux différentes phases de croissance.

Extraction de l'ADN génomique des EHEC/ Extraction des ARN totaux/

Transcription inverse des ARNm/ PCR quantitative en temps réel

Les protocoles pour ces techniques ont été décrits dans la partie « Matériels et Méthodes » du **Chapitre I**.

Activité phosphodiesterase *in vitro*

L'étude de l'activité *in vitro* de VmpA a été effectuée en collaboration avec le laboratoire du Dr Mark Gomelsky (Wyoming University, USA). Brièvement, le gène *vmpA* a été cloné dans un vecteur où la protéine VmpA produite possède une étiquette 6-Histidines afin d'être purifiée. La dégradation *in vitro* du di-GMPc a été analysée par la méthode décrite par Schmidt et al (Schmidt *et al.*, 2005).

Dosage du di-GMPc intracellulaire

Des précultures bactériennes sont effectuées à 37°C sous agitation pendant la nuit. Le lendemain, les précultures sont diluées au 1 :100 dans du LB frais, et les cultures sont mises sous agitation à 37°C. Les prélèvements sont effectués en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. Trois mL de culture sont centrifugés afin d'ôter le surnageant. Les bactéries

sont ensuite lysées dans un tampon de lyse (40% acetonitrile, 40% méthanol, 0.1% acide formique) et conservées dans ce tampon à -80°C. Le di-GMPc est ensuite dosé par la plateforme d'exploration du métabolisme du centre INRA de Theix, selon la méthode décrite par Waters (Waters *et al.*, 2008).

Tests de mobilité

Des précultures bactériennes sont incubées à 37°C sous agitation en milieu LB pendant la nuit. Le lendemain, 4 µL de chaque culture sont déposés à la surface d'un milieu semi-solide (LB + agar 0.3%) et incubés à 37°C pendant 5 h, avant de mesurer le diamètre correspondant au halo de mobilité.

Formation de biofilm

Des précultures bactériennes sont incubées à 37°C sous agitation pendant la nuit. Le lendemain, une dilution au 1 :100 des précultures est effectuée dans 200 µL de DMEM sans rouge de phénol en plaque de microtitration. Après 24 h d'incubation à 30°C, les biofilms formés sont colorés au crystal violet, puis élués dans de l'éthanol 50% avant d'être quantifiés par l'absorbance à 595 nm.

Colonisation de l'intestin de souris par les EHEC

Des souris C57BL/6 traitées à la streptomycine ont été inoculées par voie gastrique selon la méthode décrite par Wadolkowski (Wadolkowski *et al.*, 1990) avec un mutant spontané de EDL933 résistant à la streptomycine et à l'acide nalidixique, ou avec un mutant spontané de EDL933Δ*vmpA::km* résistant à la streptomycine. Les fèces sont prélevés à différents jours post-inoculation, broyés, et les *E. coli* O157:H7 sont énumérés sur milieu LB gélosé contenant soit de l'acide nalidixique (40µg/mL) soit de la kanamycine (50µg/mL).

Résultats

1. Caractérisation de VmpA

Activité phosphodiesterase in vitro de VmpA

Nous avons initié une collaboration avec le Dr Mark Gomelsky (Wyoming University, USA), spécialiste de la signalisation cellulaire par le di-GMPc. Il a reclone le gène *vmpA* à partir d'un vecteur recombinant que nous lui avons fourni afin d'étiqueter la protéine VmpA avec 6 histidines. Cette protéine a ensuite été purifiée et mise en présence de di-GMPc afin de tester son activité PDE *in vitro*.

La **Figure 67** montre que la protéine VmpA dégrade le di-GMPc *in vitro*, elle a donc une activité PDE.

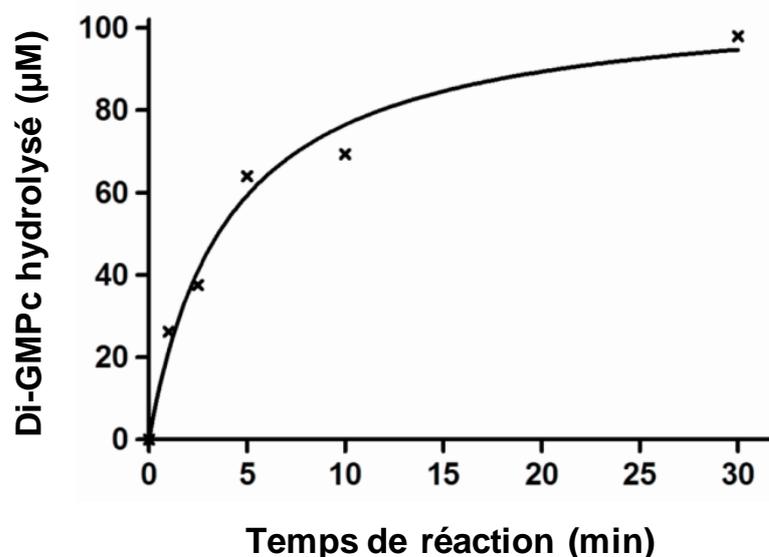


Figure 67 : Quantité de di-GMPc hydrolysée par VmpA au cours du temps.

Analyse transcriptionnelle de vmpA

- Organisation transcriptionnelle de *ycdT* et *vmpA*

Le gène *vmpA* est situé en aval du gène *ycdT*, dans le même sens de transcription (**Figure 65**). Le gène *ycdT* code pour DGC fonctionnelle chez *E. coli* K-12 souche MG1655 (Jonas *et al.*, 2008). Il a été décrit que les gènes codant pour un couple DGC/PDE régulant un mécanisme cellulaire donné sont souvent adjacents sur le chromosome et sont souvent transcrits en opéron (Tuckerman *et al.*, 2009). Nous avons donc étudié la transcription de *ycdT* et *vmpA* afin de savoir s'ils constituent une même unité transcriptionnelle.

Afin d'analyser la transcription des gènes *ycdT* et *vmpA*, nous avons rétro-transcrit les ARNm d'EDL933 et effectué différentes PCR. La **Figure 68A** représente l'organisation génomique de *ycdT* et *vmpA* ainsi que la localisation des oligonucléotides utilisés pour les différentes PCR. La **Figure 68B** représente les amplicons obtenus dans les différents échantillons avec les différents couples d'amorces.

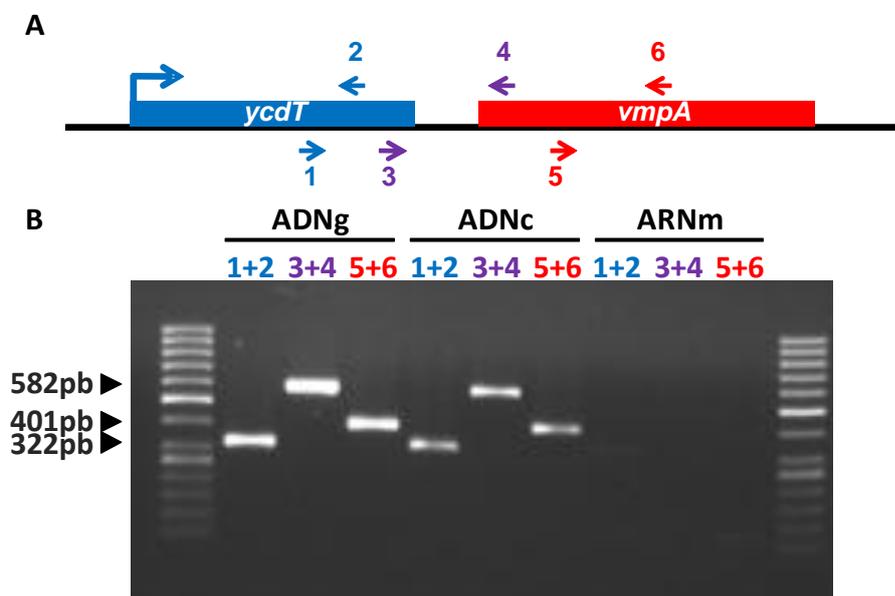


Figure 68 : Organisation transcriptionnelle de *ycdT* et *vmpA*. A- représentation schématique de l'organisation génomique de *ycdT* et *vmpA*, avec la position des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de la transcription. B- Fragments obtenus après les PCR effectuées sur les différents échantillons (ADNg : témoin positif ; ADNc : ARNm reverse-transcrits ; ARNm : ARNm non reverse-transcrits, témoin négatif).

Les oligonucléotides 3 et 4 permettent l'amplification d'un fragment dans l'échantillon ADNc mais pas dans l'échantillon ARNm (**Figure 68B**). Il n'y a donc pas de contamination ADN dans l'échantillon ARNm utilisé pour la transcription inverse. Le fragment intergénique entre *ycdT* et *vmpA* est transcrit, ce qui indique que les gènes *ycdT* et *vmpA* forment un opéron et suggère qu'ils sont impliqués dans la régulation des mêmes processus cellulaires.

- Expression de *vmpA*

Nous avons ensuite analysé l'expression de *vmpA* en début de phase exponentielle de croissance et en phase exponentielle tardive dans la souche EDL933 (**Figure 69**).

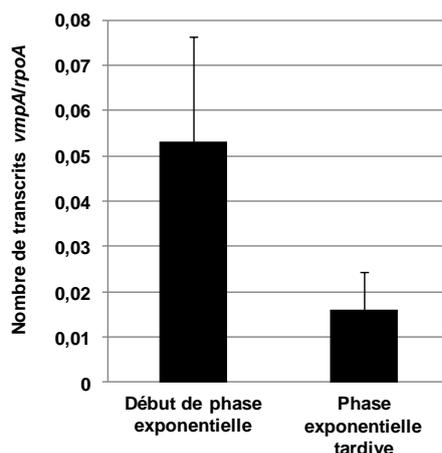


Figure 69 : Expression de *vmpA* en début de phase exponentielle (DO 0.4) et en phase exponentielle tardive (DO 1) de croissance dans la souche EDL933 (n=3).

Le gène *vmpA* est faiblement exprimé dans la souche EDL933, et cette expression a tendance à être plus élevée ($P=0.1$ par le test t de Student) en début de phase exponentielle de croissance (**Figure 69**), suggérant un rôle de VmpA plus important à ce stade.

Analyse phénotypique du mutant $\Delta vmpA::km$

- Croissance bactérienne

Sur gélose LB, les colonies du mutant $\Delta vmpA::km$ sont de taille plus petite que celles de la souche sauvage. Nous avons alors comparé la croissance du mutant $\Delta vmpA::km$ à celle de la souche sauvage parentale EDL933 (**Figure 70**).

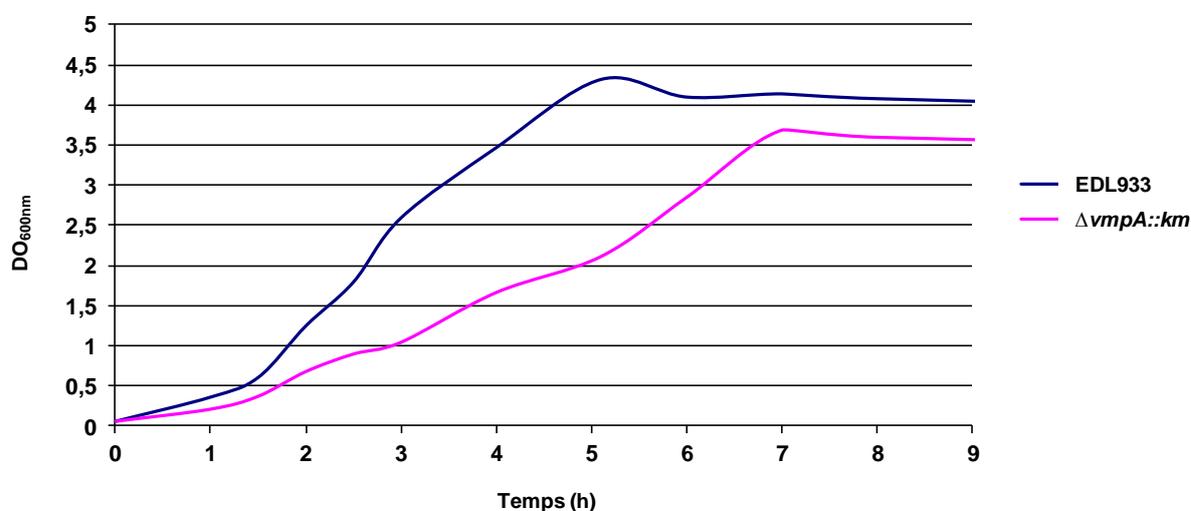


Figure 70 : Courbes de croissance en milieu LB de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$.

Le mutant $\Delta vmpA::km$ présente un retard de croissance comparativement à la souche sauvage puisque le temps génération du mutant est de 36 min alors que celui de la souche sauvage est de 27 min (**Figure 70**). Cela confirme les observations sur milieu gélosé.

Les objectifs de l'étude étaient de connaître l'implication du di-GMPc dans la cascade de régulation du LEE en condition de pH acide (retrouvé dans l'estomac) et de pH neutre (retrouvé dans l'intestin), en début et en fin de phase exponentielle de croissance. Nous avons pour cela utilisé le milieu minimum EG, à pH 5 et pH 7. Afin de déterminer les DO de prélèvement des échantillons pour chaque phase de croissance, nous avons effectué des courbes de croissance en milieu EG à pH 5 (**Figure 71**) et pH 7 (**Figure 72**).

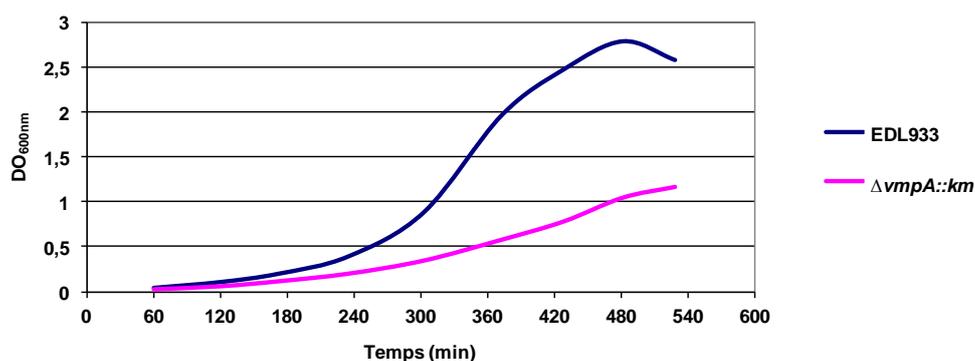


Figure 71 : Courbes de croissance en milieu EG pH 5 de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$.

Le mutant $\Delta vmpA::km$ présente un retard de croissance important en milieu EG à pH 5 (**Figure 71**). Nous avons donc déterminé la DO de prélèvement des échantillons pour le début de la phase exponentielle de croissance à 0.4 pour les deux souches et pour la phase exponentielle tardive à DO 2 pour la souche sauvage et 0.8 pour le mutant $\Delta vmpA::km$.

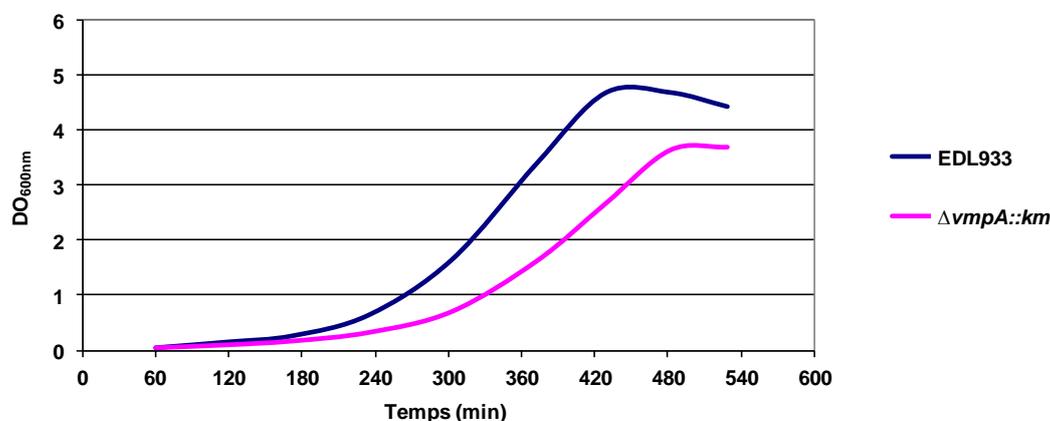


Figure 72 : Courbes de croissance en milieu EG pH 7 de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::km$.

Le mutant $\Delta vmpA::km$ présente un léger retard de croissance en milieu EG à pH neutre (**Figure 72**). Nous avons donc déterminé la DO de prélèvement des échantillons pour le début de phase exponentielle de croissance à 0.4 pour les deux souches et pour la phase exponentielle tardive à 3 pour les deux souches également.

- Polarité de la délétion de *vmpA*

L'inactivation d'un gène par insertion peut engendrer un défaut d'expression du gène en aval et les phénotypes observés dans le mutant peuvent alors provenir de ce défaut d'expression et non de la délétion du gène en amont. Afin de vérifier que le remplacement du gène *vmpA* par une cassette de résistance à la kanamycine n'induit pas de défaut d'expression du gène adjacent en aval, *z1530*, nous avons effectué des qRT-PCR dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta vmpA::km$ pour l'expression du gène *z1530*. Les résultats sont donnés en relatif par rapport à l'expression de la souche sauvage (**Figure 73**).

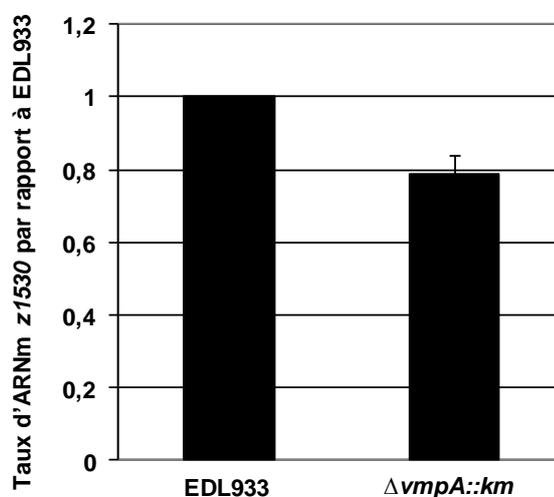


Figure 73 : Expression relative du gène *z1530* dans la souche sauvage et le mutant $\Delta vmpA::km$ en milieu EG pH 7 en phase exponentielle de croissance (n=3).

L'expression du gène *z1530* n'est pas significativement diminuée dans le mutant $\Delta vmpA::km$ comparée à l'expression chez la souche sauvage (**Figure 73**). La délétion de *vmpA* n'est donc pas polaire.

- Concentration intracellulaire en di-GMPc

VmpA possède une activité PDE *in vitro*. Pour confirmer son activité *in vivo*, nous avons dosé le di-GMPc intracellulaire dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta vmpA::km$, en début de phase exponentielle et en phase exponentielle tardive de croissance en milieu LB (**Figure 74**).

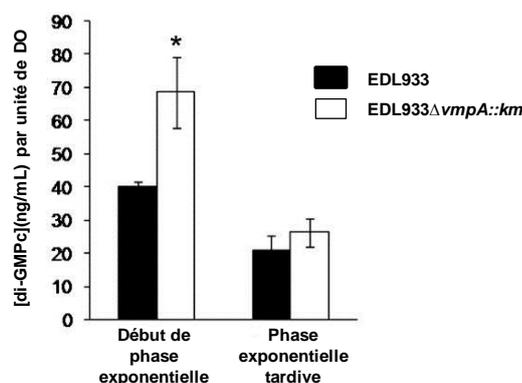


Figure 74 : Concentration intracellulaire en di-GMPc de la souche sauvage EDL933 et du mutant Δ vmpA::km en début de phase exponentielle et en phase exponentielle tardive (n=3). * : $P < 0.05$

La concentration intracellulaire en di-GMPc est significativement plus élevée dans le mutant Δ vmpA::km que dans la souche sauvage en début de phase exponentielle de croissance uniquement (**Figure 74**). La protéine VmpA est donc une PDE active *in vivo*, et plus particulièrement en début de phase exponentielle de croissance. Certaines protéines PDE ou DGC modulent uniquement la concentration locale en di-GMPc, et leur inactivation n'engendre pas de différence de la concentration intracellulaire globale en di-GMPc. VmpA joue un rôle dans la concentration globale en di-GMPc en début de phase exponentielle de croissance, ce qui suggère un rôle important de la protéine dans le métabolisme global du di-GMPc des EHEC à cette phase de croissance.

- Mobilité bactérienne

Une diminution de la mobilité est souvent associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en di-GMPc chez différentes espèces bactériennes. Nous avons donc analysé la mobilité du mutant Δ vmpA::km comparativement à la souche sauvage (**Figure 75**).

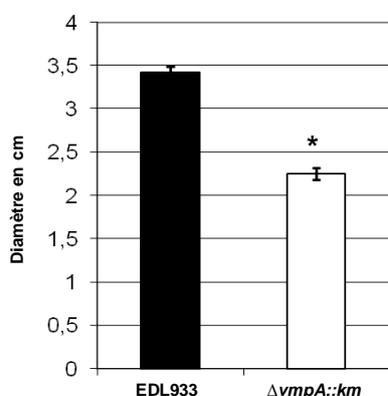


Figure 75 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933 et du mutant EDL933 Δ vmpA::km. Diamètres mesurés après 5 h (n=3). * : $P < 10^{-4}$

Le mutant $\Delta vmpA::km$ est moins mobile que la souche sauvage (**Figure 75**). Une augmentation de la concentration intracellulaire en di-GMPc diminue par conséquent la mobilité bactérienne chez les EHEC.

- Formation de biofilm

A l'inverse de la mobilité, la formation de biofilm est généralement augmentée dans une souche bactérienne synthétisant plus de di-GMPc. Nous avons analysé la formation de biofilm par la souche sauvage EDL933 et le mutant $\Delta vmpA::km$ (**Figure 76**).

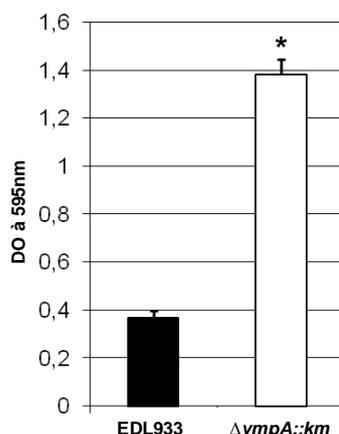


Figure 76 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933 et le mutant EDL933 $\Delta vmpA::km$ après 24 h à 30°C (n=3). $P < 10^{-7}$

Le mutant $\Delta vmpA::km$ forme un biofilm plus important que la souche sauvage (**Figure 76**). Une augmentation de la concentration intracellulaire en di-GMPc favorise par conséquent la formation de biofilm chez les EHEC.

- Expression des gènes du LEE

Avant mon arrivée au laboratoire, des résultats préliminaires avaient montré que VmpA réprimait l'expression de l'AFI et activait l'expression des gènes du LEE. Afin de confirmer ces résultats et d'élaborer un modèle de régulation par le di-GMPc aux différents pH et phases de croissance, nous avons effectué des qRT-PCR sur les ADNc issus des souches suivantes : EDL933, $\Delta vmpA::km$, $\Delta gadE$, $\Delta gadX$ et Δler , afin d'analyser le rôle des différentes protéines dans la régulation du LEE et de l'AFI. Les qRT-PCR sur les ADNc issus des mutants utilisés dans le **Chapitre I** sont nécessaires puisque nous utilisons des conditions de croissance différentes et il est connu que la régulation du LEE et de l'AFI peut varier en fonction du milieu de culture utilisé, du pH ainsi que de la phase de croissance.

- Régulation de l'expression de *gadE*

Nous avons étudié l'expression de *gadE* dans la souche sauvage et les mutants $\Delta vmpA ::km$, $\Delta gadX$ et Δler , en début de phase exponentielle ou en phase exponentielle tardive de croissance en milieu minimum EG à pH 5 et pH 7 (**Figure 77**).

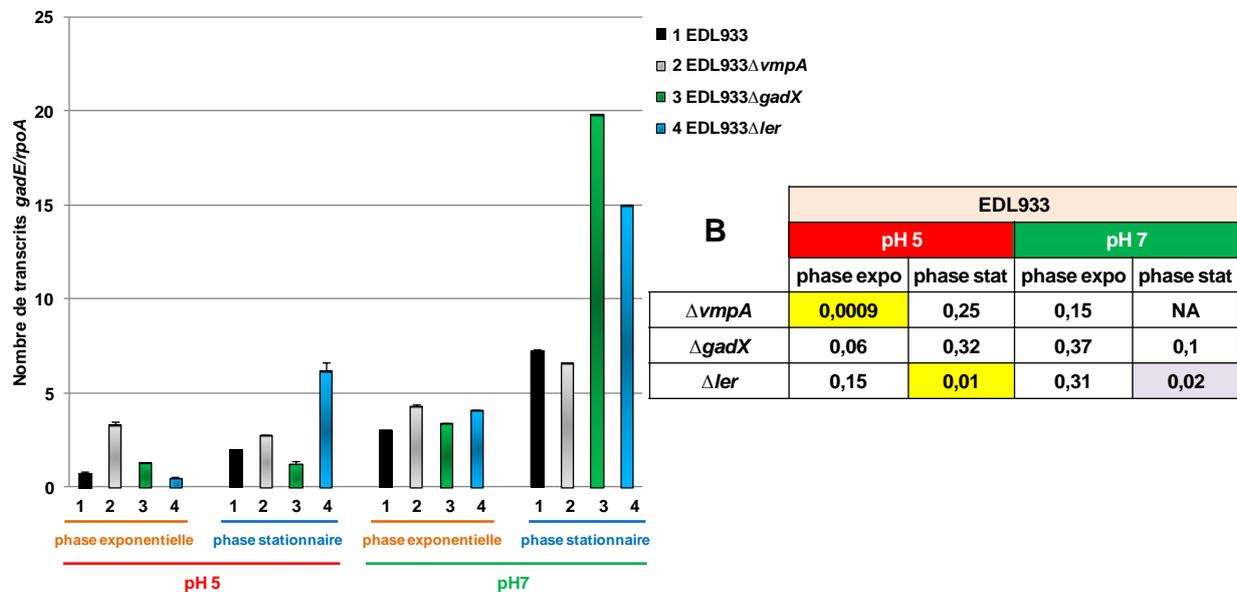


Figure 77 : A- Expression du gène *gadE* dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA ::km$, le mutant $\Delta gadX$ et le mutant Δler (n=3), en début de phase exponentielle (D) ou en fin de phase exponentielle (F). * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$. B- Résultats du test *t* de Student effectué sur les valeurs obtenues chez la souche sauvage et les différents mutants pour chaque condition testée. Surlignage violet : $P < 0.05$; surlignage jaune : $P < 0.01$; NA : non applicable.

Le gène *gadE* est plus exprimé en fin de phase exponentielle dans la souche sauvage. Il est également plus exprimé à pH 7 qu'à pH 5 (**Figure 77**). VmpA réprime l'expression de *gadE* uniquement en début de phase exponentielle à pH 5, alors que Ler réprime l'expression de *gadE* en phase exponentielle tardive aux deux pH. GadX n'influence pas l'expression de *gadE* en milieu minimum.

- Régulation de l'expression de *gadX*

Nous avons ensuite étudié l'expression de *gadX* dans la souche sauvage et les mutants $\Delta vmpA ::km$, $\Delta gadX$ et Δler , en début de phase exponentielle ou en phase exponentielle tardive de croissance en milieu minimum EG à pH 5 et pH 7 (**Figure 78**).

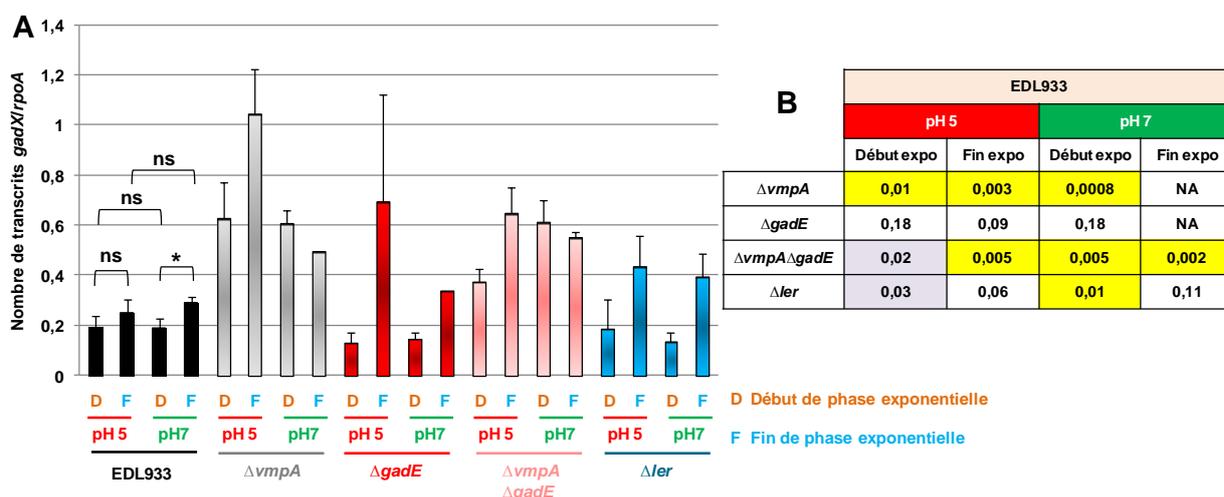


Figure 78 : A- Expression du gène *gadX* dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA ::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA \Delta gadE$ et le mutant Δler (n=3), en début de phase exponentielle (D) ou en fin de phase exponentielle (F). * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$. B- Résultats du test *t* de Student effectué sur les valeurs obtenues chez la souche sauvage et les différents mutants pour chaque condition testée. Surlignage violet : $P < 0.05$; surlignage jaune : $P < 0.01$; NA : non applicable.

L'expression de *gadX* à pH 5 est identique en début et en fin de phase exponentielle, et est identique en début de phase exponentielle à pH 5 et à pH 7. En revanche, l'expression de *gadX* augmente en phase exponentielle tardive à pH 7 (**Figure 78**). VmpA réprime l'expression de *gadX* dans toutes les conditions, Ler en début de phase exponentielle à pH 5 et pH 7, alors que GadE n'a aucun effet sur l'expression de *gadX* dans ces conditions.

- Régulation de l'expression de *ler*

Nous avons ensuite étudié l'expression de *ler* dans la souche sauvage et les mutants $\Delta vmpA ::km$, $\Delta gadE$ et Δler , en début de phase exponentielle ou en phase exponentielle tardive de croissance en milieu minimum EG à pH 5 et pH 7 (**Figure 79**).

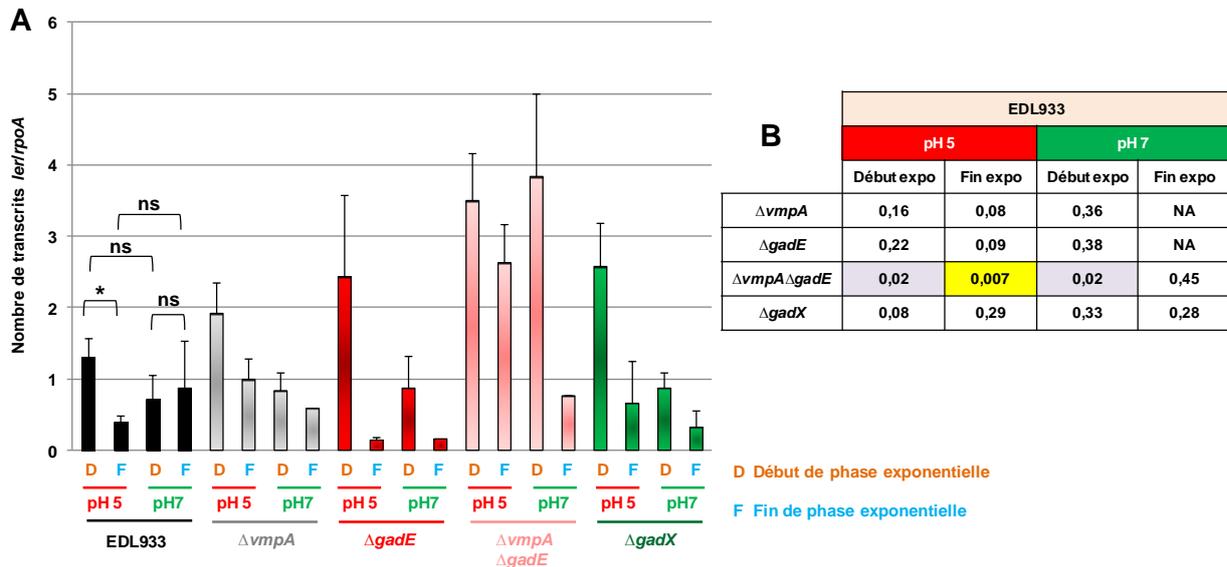


Figure 79 : A- Expression du gène *ler* dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA ::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$ et le mutant $\Delta gadX$ (n=3), en début de phase exponentielle (D) ou en fin de phase exponentielle (F). * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$. B- Résultats du test *t* de Student effectué sur les valeurs obtenues chez la souche sauvage et les différents mutants pour chaque condition testée. Surlignage violet : $P < 0.05$; surlignage jaune : $P < 0.01$; NA : non applicable.

L'expression de *ler* est plus importante en début de phase exponentielle qu'en phase exponentielle tardive à pH 5 (**Figure 79**). A pH 7, l'expression de *ler* n'est pas différente en début de phase exponentielle et en phase exponentielle tardive, et cette expression est intermédiaire à celles observées à pH 5. Ni VmpA, ni GadE, ni GadX n'ont d'effet significatif sur l'expression de *ler* dans les différentes conditions. Cependant, on peut voir que dans le double mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$ l'expression de *ler* est activée à pH 5 dans les deux phases de croissance et en début de phase exponentielle à pH 7. Ces résultats suggèrent que, dans ces conditions, VmpA et GadE répriment l'expression de *ler* de façon indépendante et cumulative.

- Régulation de l'expression de *espA*

Nous avons ensuite étudié l'expression de *espA* dans la souche sauvage et les mutants $\Delta vmpA ::km$, $\Delta gadX$ et Δler , en début de phase exponentielle ou en phase exponentielle tardive de croissance en milieu minimum EG à pH 5 et pH 7 (**Figure 80**).

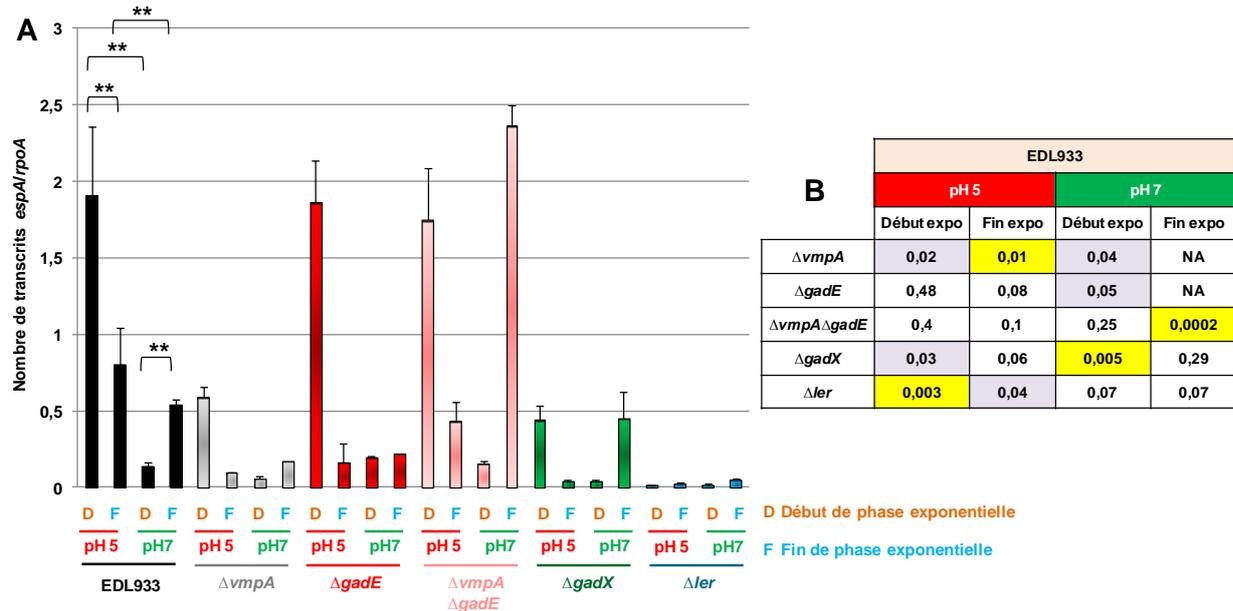


Figure 80 : A- Expression du gène *espA* dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA ::km$, le mutant $\Delta gadE$, le mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$, le mutant $\Delta gadX$ et le mutant Δler (n=3), en début de phase exponentielle (D) ou en fin de phase exponentielle (F). * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$. **B-** Résultats du test *t* de Student effectué sur les valeurs obtenues chez la souche sauvage et les différents mutants pour chaque condition testée. Surlignage violet : $P < 0.05$; surlignage jaune : $P < 0.01$; NA : non applicable.

L'expression de *espA* est plus élevée en début de phase exponentielle qu'en phase exponentielle tardive à pH 5 (**Figure 80**). En revanche, on observe l'inverse à pH 7, c'est-à-dire que l'expression de *espA* est plus importante en phase exponentielle tardive qu'en début de phase exponentielle. VmpA active l'expression de *espA* dans toutes les conditions, alors que Ler ne semble activer l'expression de *espA* qu'à pH 5. Cependant, la valeur du test *t* de Student est de 0.07, il y a donc une tendance à l'activation de l'expression de *espA* aux deux phases de croissance à pH 7. GadE réprime l'expression de *espA* à pH 7 alors que la répression de *espA* par GadX est plutôt en début de phase exponentielle à pH 5 et pH 7. Il est surprenant de noter que l'expression de *espA* est fortement activée dans le double mutant $\Delta vmpA\Delta gadE$ en phase exponentielle tardive à pH 7 uniquement, alors que l'expression de *espA* reste inchangée dans les simples mutants $\Delta vmpA ::km$ et $\Delta gadE$. Cependant, concernant les qRT-PCR dans les mutants $\Delta vmpA ::km$ et $\Delta gadE$, seulement deux des échantillons sont analysables, il est donc nécessaire d'effectuer d'autres expériences afin de confirmer ces résultats.

- Modèle de régulation du LEE en milieu EG par le di-GMPc

A partir des résultats de qRT-PCR, nous avons élaboré un modèle de régulation de l'expression du LEE par le di-GMPc (VmpA) pour chaque condition étudiée.

- 1) Régulation de l'expression du LEE, de *gadE* et *gadX* par VmpA, GadE et GadX en **début de phase exponentielle** de croissance à **pH 5**

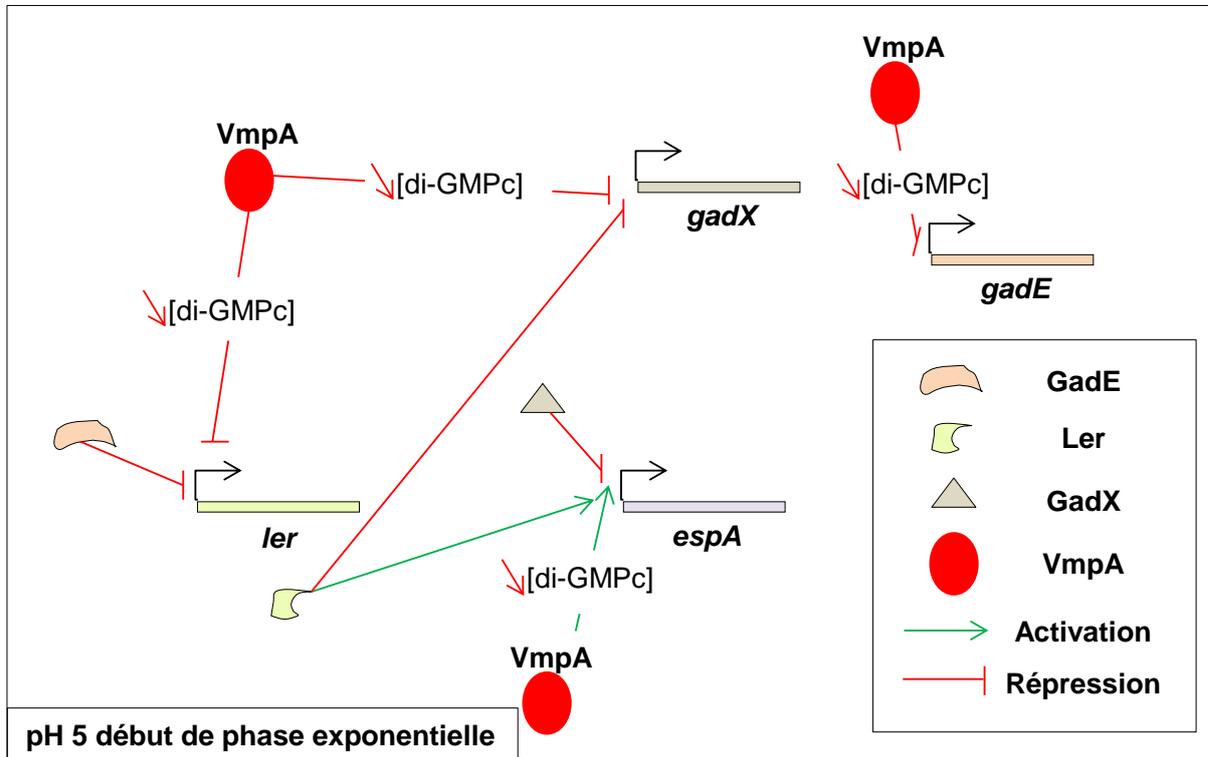


Figure 81 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA et par conséquent de faibles concentrations en di-GMPc, à pH 5 en début de phase exponentielle de croissance.

En début de phase exponentielle de croissance à pH 5, une faible concentration en di-GMPc due à l'activité de VmpA réprime l'expression de *ler*, de *gadX* et de *gadE*, et active l'expression de *espA* (**Figure 81**). Ler active l'expression de *espA* et réprime celle de *gadX*. GadE réprime l'expression de *ler*, et GadX réprime l'expression de *espA*.

2) Régulation de l'expression du LEE, de *gadE* et *gadX* par VmpA, GadE et GadX en fin de phase exponentielle de croissance à pH 5

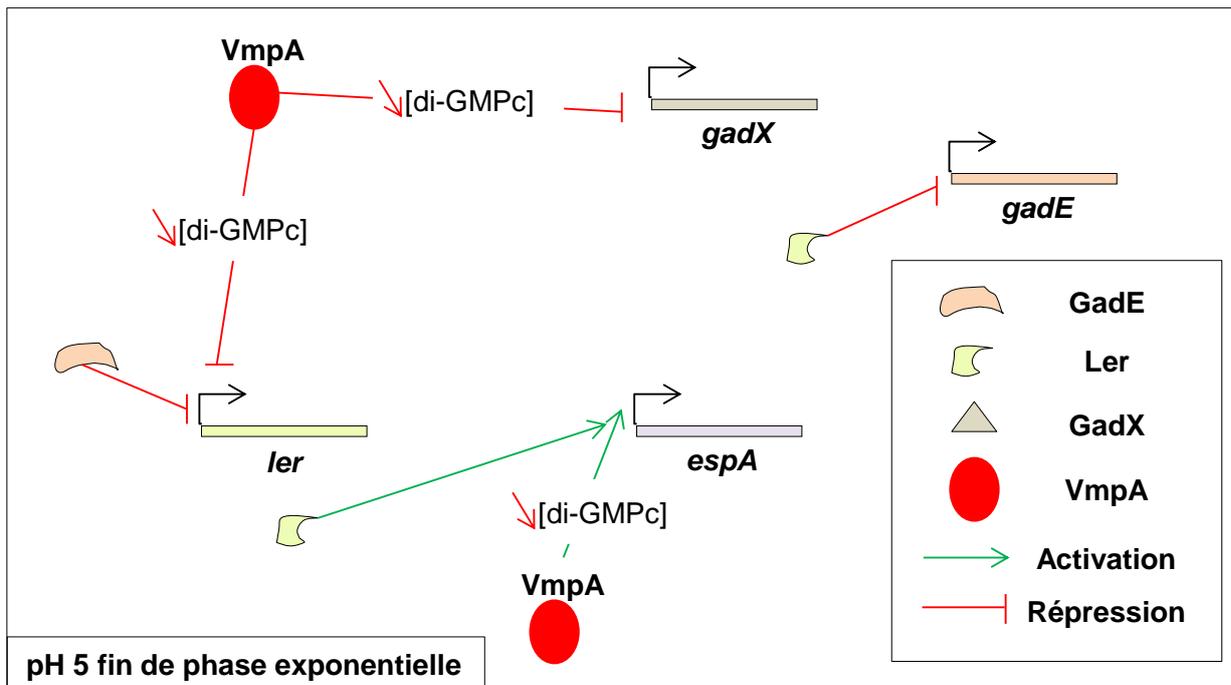


Figure 82 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA et par conséquent de faibles concentrations en di-GMPc, à pH 5 en phase exponentielle tardive de croissance.

En phase exponentielle tardive de croissance à pH 5, une faible concentration en di-GMPc réprime l'expression de *ler* et *gadX* et active l'expression de *espA* (**Figure 82**). Ler active l'expression de *espA* et réprime celle de *gadE*. GadE réprime l'expression de *ler*.

L'expression de *gadE* et de *gadX* est identique en début de phase exponentielle et en fin de phase exponentielle. Cependant, l'expression de *ler* et *espA* est plus faible en fin de phase exponentielle qu'en début de phase exponentielle. Cette répression n'apparaît pas sur les modèles de régulation présentés Figure 81 et Figure 82 car l'expression de *ler* et *espA* est réprimée en fin de phase exponentielle dans tous les mutants étudiés, suggérant que le régulateur impliqué dans la répression de *ler* et *espA* en fin de phase exponentielle de croissance n'est pas un des régulateurs étudiés.

3) Régulation de l'expression du LEE, de *gadE* et *gadX* par VmpA, GadE et GadX en début de phase exponentielle de croissance à pH 7

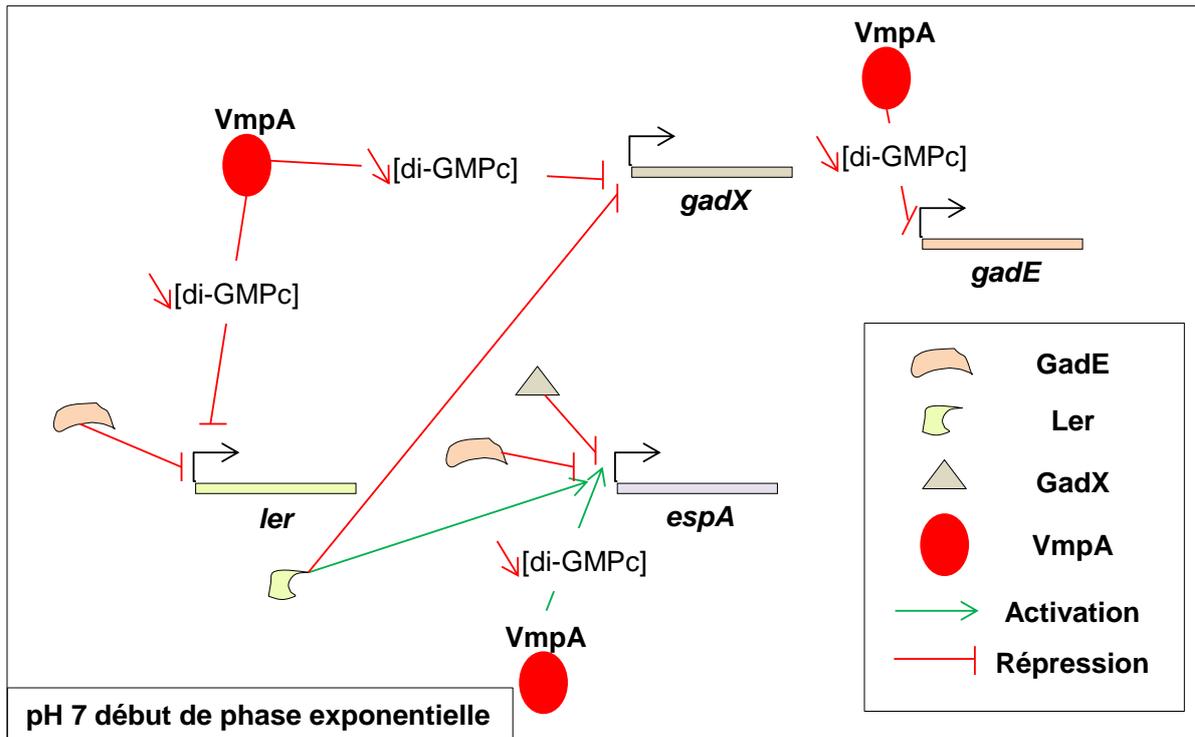


Figure 83 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA et par conséquent de faibles concentrations en di-GMPc, à pH 7 en phase exponentielle de croissance.

En début de phase exponentielle de croissance à pH 7, une faible concentration en di-GMPc due à l'activité de VmpA réprime l'expression de *ler*, *gadX* et *gadE* et active celle de *espA* (**Figure 83**). Ler active l'expression de *espA* et réprime celle de *gadX*. GadE réprime l'expression de *ler* et *espA*. GadX réprime l'expression de *espA*.

Si on compare les résultats obtenus à pH 5 et pH 7 en début de phase exponentielle de croissance, on voit qu'en qRT-PCR l'expression de *gadE* est plus élevée à pH 7 qu'à pH 5, alors que l'expression de *gadX* est identique. Cette expression plus importante de *gadE* induit une répression plus importante de *ler* à pH 7. D'autre part, la répression de *ler*, la surexpression de *gadE* et l'activité de GadX conduisent à la répression de l'expression de *espA*.

4) Régulation de l'expression du LEE, de *gadE* et *gadX* par VmpA, GadE et GadX en fin de phase exponentielle de croissance à pH 7

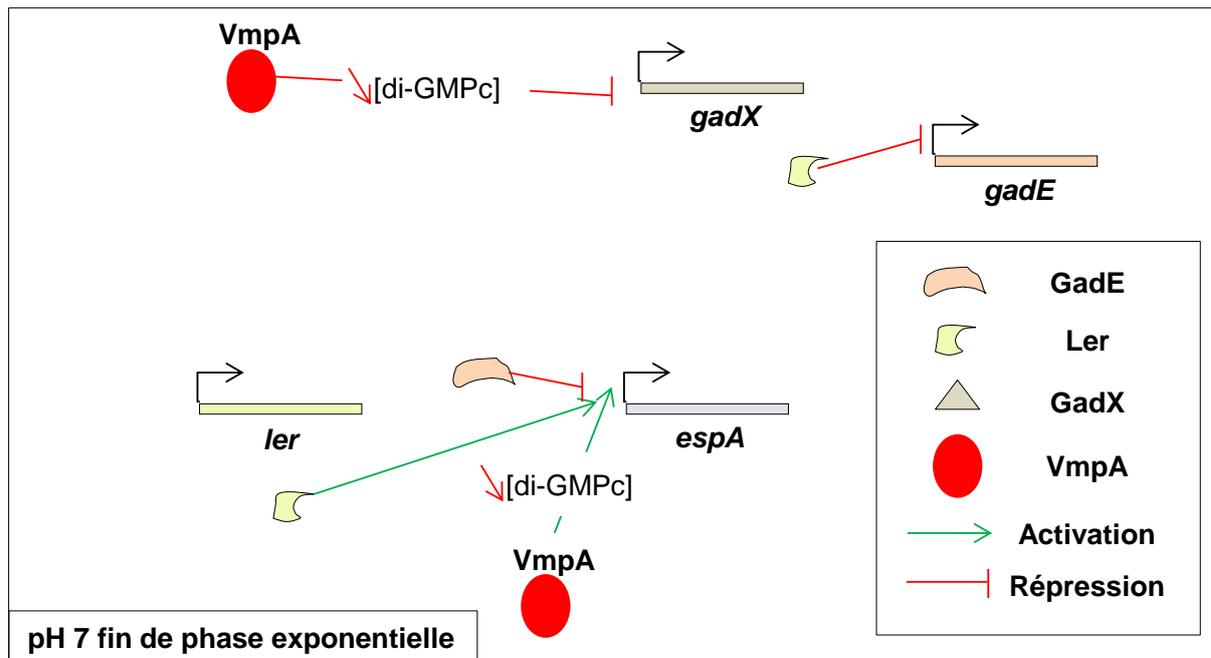


Figure 84 : Modèle de régulation de l'expression du LEE en présence de VmpA et par conséquent de faibles concentrations en di-GMPc, à pH 7 en phase exponentielle tardive de croissance.

En phase exponentielle tardive de croissance à pH 7, une faible concentration en di-GMPc réprime l'expression de *gadX* et active celle de *espA* (**Figure 84**). *Ler* active l'expression de *espA* et réprime celle de *gadE*. *GadE* réprime l'expression de *espA*.

L'expression de *gadE* et de *gadX* est activée en fin de phase exponentielle comparée à l'expression observée en début de phase exponentielle. En fin de phase exponentielle, *Ler* ne réprime plus l'expression de *gadX*, expliquant l'activation de l'expression de *gadX*. En début de phase exponentielle, l'activité de VmpA, conduisant à une faible concentration en di-GMPc, réprime l'expression de *gadE* alors que *Ler* n'a aucun effet. En fin de phase exponentielle, on observe l'inverse, c'est-à-dire que *Ler* réprime l'expression de *gadE* alors que VmpA n'a aucun effet. Ces observations suggèrent que la répression de l'expression de *gadE* due à la faible concentration en di-GMPc est plus forte que celle exercée par *Ler*. L'expression de *ler* n'est pas significativement augmentée en fin de phase exponentielle et l'expression de *espA* est augmentée. La concentration en di-GMPc et *GadE* ne répriment plus l'expression de *ler*. Ces observations suggèrent qu'un autre régulateur réprime l'expression de *ler* en absence de *GadE* et VmpA en fin de phase exponentielle. *GadX* ne réprime plus l'expression de *espA*, et l'expression de *espA* est activée en fin de phase exponentielle.

Si l'on compare la régulation des différents gènes à pH 5 et pH 7 en fin de phase exponentielle, on voit que l'expression de *gadE* est plus élevée à pH 7 qu'à pH 5 alors que celle de *gadX* n'est pas affectée par le pH. Le modèle ne présente aucune différence de régulation de *gadE* et *gadX* à pH 5 et pH 7 en fin de phase exponentielle. Un autre régulateur que ceux étudiés activerait l'expression de *gadE* à pH 7 ou la réprimerait à pH 5. D'autre part, le modèle suggère une augmentation de l'expression de *ler* et *espA* à pH 7. Or nos résultats montrent que l'expression de *ler* n'est pas affectée par le pH en fin de phase exponentielle et que l'expression de *espA* est réprimée à pH 7. Ces observations suggèrent qu'un autre régulateur réprime l'expression de *ler* et *espA* à pH 7 ou l'active à pH 5.

Pour confirmer ce modèle, il serait nécessaire d'effectuer des dosages de la concentration intracellulaire en di-GMPc.

- Colonisation d'un modèle murin

Afin de savoir si la diminution de l'expression du LEE dans le mutant $\Delta vmpA::km$ est corrélée à une diminution de la colonisation, nous avons utilisé le modèle bien décrit des souris traitées à la streptomycine (Wadolowski *et al.*, 1990).

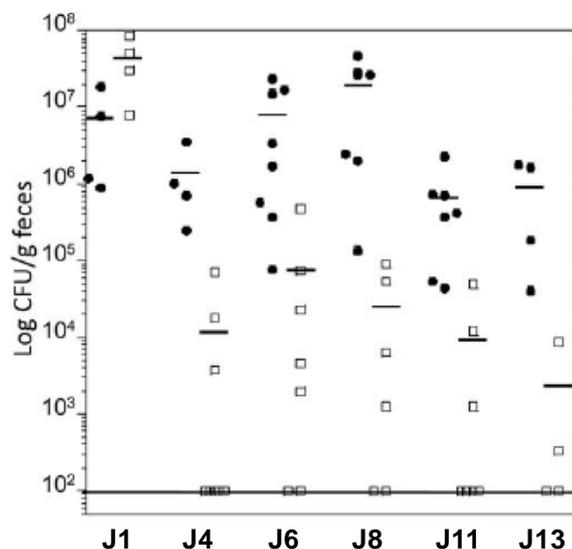


Figure 85 : Colonisation intestinale des souris traitées à la streptomycine. Chaque rond noir correspond à une souris infectée par la souche sauvage EDL933 et chaque carré blanc représente une souris infectée avec le mutant $\Delta vmpA::km$. Les traits horizontaux représentent les moyennes.

La souche sauvage colonise l'intestin murin, puisqu'au dernier prélèvement (J13), 10^6 ufc par gramme de fèces sont encore comptabilisées (**Figure 85**). En revanche, le mutant $\Delta vmpA::km$ colonise très peu l'intestin murin. En effet, au jour 4, seulement 10^4 ufc par gramme de fèces sont comptabilisées, et 10^3 au jour 13. Ces résultats suggèrent que le di-GMPc diminue

la virulence d'*E. coli* O157:H7 en limitant la colonisation intestinale. Ils sont en adéquation avec les résultats obtenus *in vitro*, *i.e.* l'inhibition de l'expression des gènes du LEE dans le mutant $\Delta vmpA::km$, démontrée par l'analyse transcriptomique et les qRT-PCR.

2. Complémentation du mutant EDL933 $\Delta vmpA$

Afin de confirmer que les phénotypes observés dans le mutant $\Delta vmpA::km$ sont dus à la mutation de *vmpA* et non à la mutation accidentelle d'un autre gène, il est nécessaire de compléter le mutant.

Complémentation en trans

Nous avons cloné *vmpA* dans un vecteur d'expression à faible nombre de copies sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (pAra). Bien que le plasmide recombinant p33*vmpA* ainsi obtenu se maintienne chez une souche *E. coli* K-12 (Top10), il n'a pas été possible d'obtenir des clones $\Delta vmpA::km$ transformés, même en l'absence d'activation du promoteur pAra (absence d'arabinose et présence de glucose). Nous avons analysé la croissance de la souche Top10 hébergeant le plasmide p33*vmpA* en présence de différentes concentrations d'arabinose (**Figure 86**).

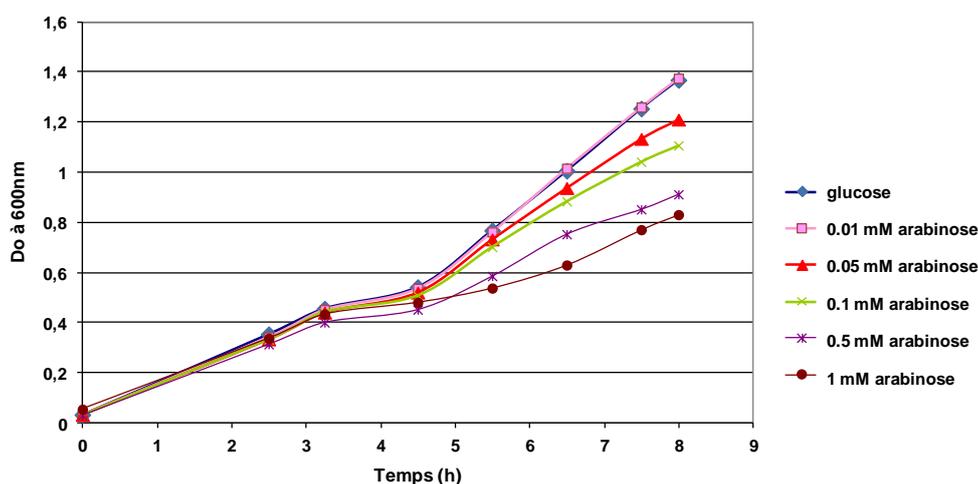


Figure 86 : Courbes de croissance de la souche Top10(p33*vmpA*) en présence de glucose ou de différentes concentrations d'arabinose.

La croissance de la souche Top10 (p33*vmpA*) est ralentie avec l'augmentation de la concentration en arabinose (**Figure 86**).

Nous avons alors comparé l'expression de *vmpA* en présence de glucose et de différentes concentrations d'arabinose dans la souche *E. coli* K-12 Top10 (p33*vmpA*), et sans glucose et sans arabinose dans la souche EHEC EDL933 (**Figure 87**).

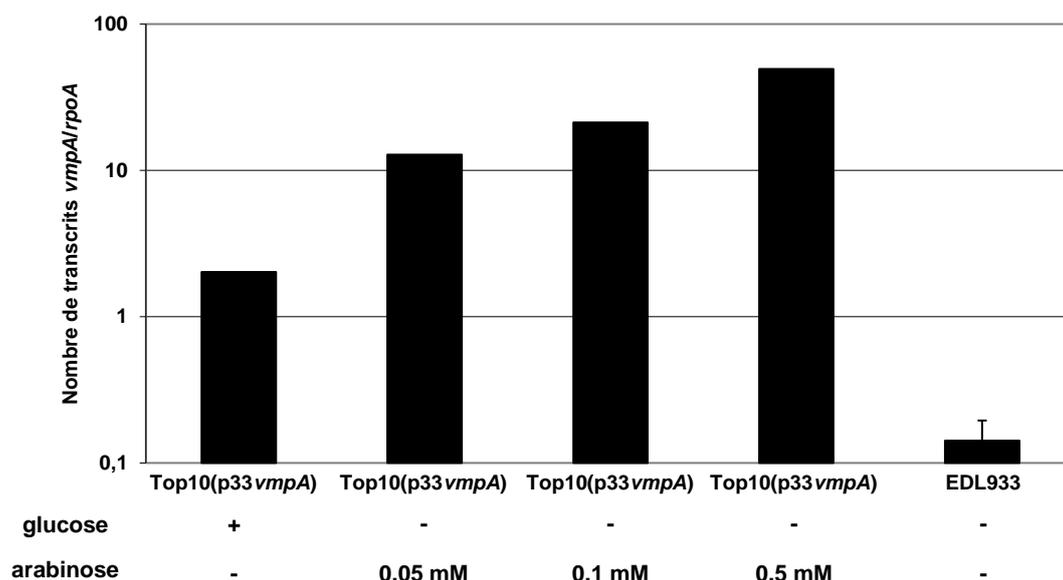


Figure 87 : Nombre de transcrits du gène *vmpA* dans la souche *E. coli* K-12 (Top10) hébergeant le plasmide p33*vmpA* en présence de glucose ou de différentes concentrations d'arabinose ainsi que dans la souche EDL933.

L'expression du gène *vmpA* augmente avec la concentration d'arabinose présente dans le milieu (**Figure 87**). En corrélation avec les courbes de croissance, ces résultats suggèrent qu'une trop forte concentration de VmpA, et par conséquent une trop faible concentration en di-GMPc, est toxique pour la bactérie. En absence d'induction, *vmpA* est exprimé 10 fois plus dans la souche Top10 hébergeant le plasmide recombinant que dans la souche EHEC EDL933. Le gène *vmpA* étant naturellement absent de la souche *E. coli* K-12, il est possible que l'activité de VmpA soit réduite dans la souche Top10(p33*vmpA*) ou que l'activité d'une ou plusieurs DGC compense celle de VmpA, ce qui ne serait pas le cas dans la souche EDL933. Une trop forte expression de *vmpA* dans EDL933 serait alors létale. Ceci expliquerait pourquoi le plasmide recombinant se maintient dans la souche *E. coli* K-12 mais pas dans la souche EDL933.

Nous avons alors analysé la concentration en di-GMPc dans la souche *E. coli* K-12 Top10 (p33*vmpA*) en fonction de la concentration en glucose ou en arabinose (**Figure 88**).

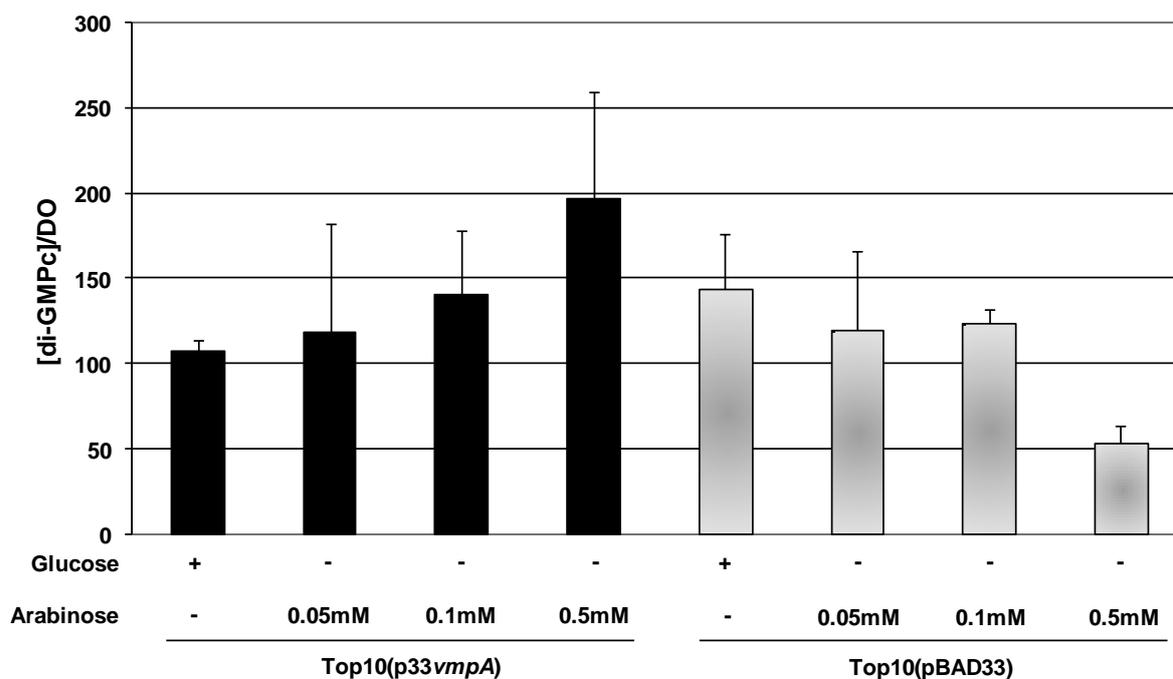


Figure 88 : Concentration en di-GMPc dans la souche *E. coli* K-12 transformée avec le plasmide recombinant p33vmpA ou le plasmide vide (pBAD33) en présence de glucose ou de différentes concentrations d'arabinose (n=3).

Dans la souche hébergeant le plasmide recombinant p33vmpA, la concentration en di-GMPc n'est pas diminuée lorsque la concentration en arabinose augmente (**Figure 88**). De plus, on peut voir que les concentrations en di-GMPc dans la souche hébergeant le plasmide recombinant ainsi que celle observées dans la souche hébergeant le plasmide vide sont similaires. Ces résultats suggèrent que VmpA est peu ou pas active dans la souche K-12 Top10, ou alors que l'activité des DGC compense celle de VmpA.

Complémentation chromosomique (en cis)

Suite à cela, nous avons décidé d'adopter une autre stratégie pour la complémentation : cloner le gène vmpA dans un plasmide suicide qui s'intègre dans le chromosome par recombinaison homologe et permet de replacer le gène sous son promoteur d'origine, en simple copie. Le plasmide utilisé est pKO3 (Link *et al.*, 1997).

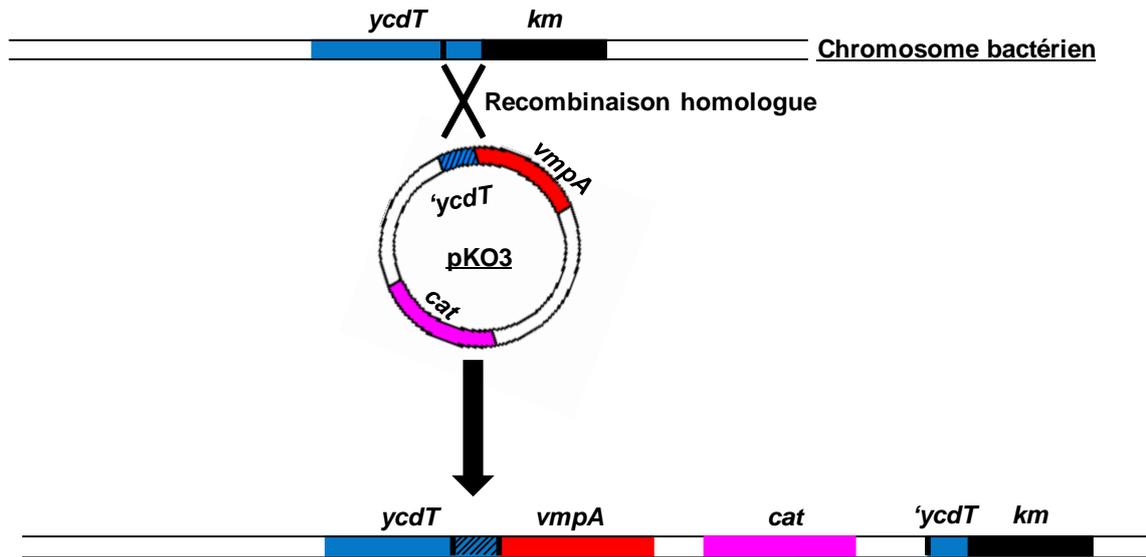


Figure 89 : Schéma de l'intégration chromosomique du plasmide recombinant pKO3'*ycdTvmpA* pour la complémentation en *cis* du mutant $\Delta vmpA::km$.

Le schéma de la **Figure 89** représente l'intégration chromosomique du plasmide recombinant pKO3'*ycdTvmpA* pour la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$. Le gène *vmpA* est remplacé à sa localisation génomique sous contrôle de son propre promoteur en aval de *ycdT*.

Nous avons vérifié l'expression de *vmpA* dans le mutant $\Delta vmpA::km$ complétement en *cis* ($\Delta vmpA::kmC$) (**Figure 90**).

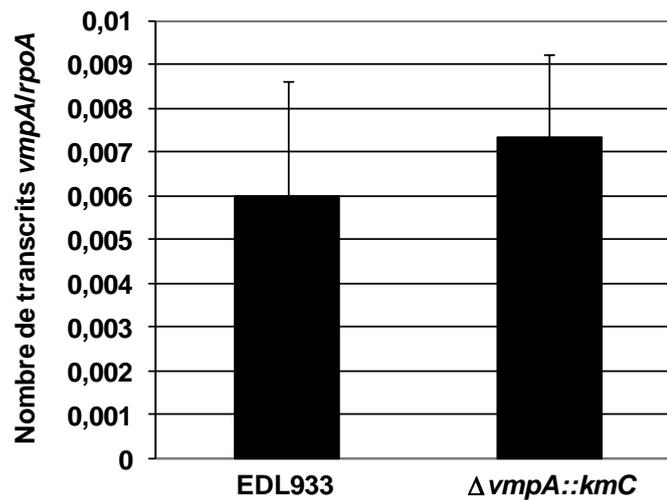


Figure 90 : Expression de *vmpA* dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta vmpA::km$ complétement en *cis*, $\Delta vmpA::kmC$ (n=4).

L'expression de *vmpA* est identique dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (**Figure 90**).

- Mobilité bactérienne

Nous avons analysé la mobilité bactérienne dans la souche sauvage, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 91).

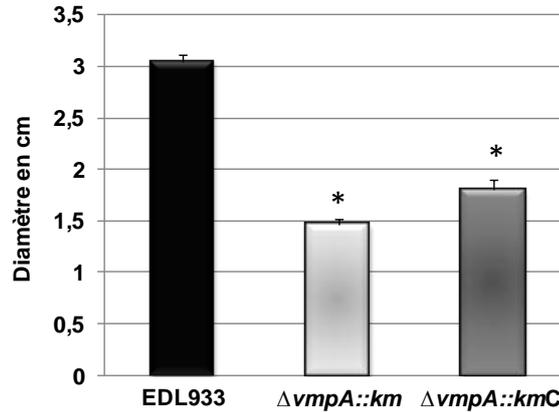


Figure 91 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (n=4). * : $P < 0.05$.

La mobilité n'est pas restaurée dans le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 91).

- Formation de biofilm

Nous avons analysé la formation de biofilm dans la souche sauvage, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant complétement $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 92).

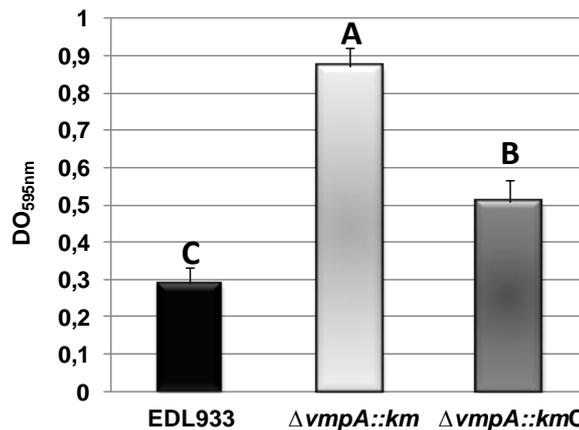


Figure 92 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant complétement $\Delta vmpA::kmC$ (n=7). Test statistique ANOVA.

La formation de biofilm est partiellement restaurée dans le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 92).

- Expression des gènes *ler* et *gadE*

Afin de voir si l'expression des gènes est restaurée dans le mutant complétementé, nous avons regardé l'expression d'un gène du LEE : *ler*, et d'un gène de l'AFI : *gadE*, en milieu LB en phase exponentielle de croissance dans la souche sauvage EDL933, le mutant $\Delta vmpA::km$ et le mutant complétementé $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 93).

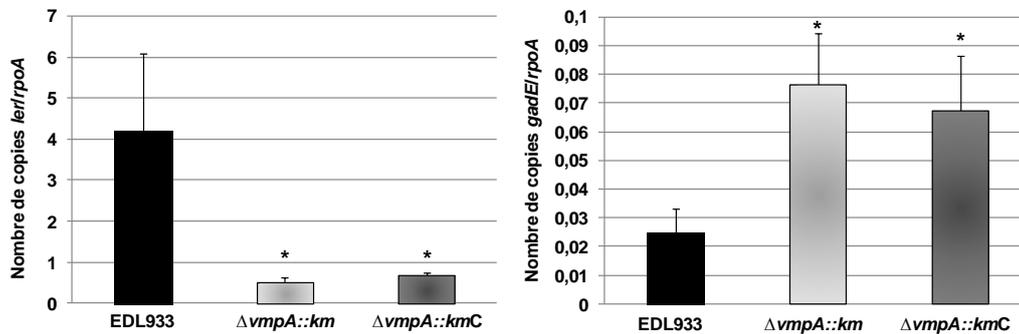


Figure 93 : A- Expression du gène *ler* dans la souche EDL933, le mutant $\Delta vmpA$ et le mutant complétementé $\Delta vmpA::kmC$ (n=4). * : $p < 0.05$. B- Expression du gène *gadE* dans la souche EDL933, le mutant $\Delta vmpA$ et le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (n=4). * : $P < 0.05$.

Ni l'expression de *ler* ni celle de *gadE* ne sont restaurées dans le mutant $\Delta vmpA::kmC$ (Figure 93).

Complémentation par échange d'allèle (en cis)

Suite à cela, nous avons adopté une autre stratégie de complémentation. Nous nous sommes demandé si l'expression d'un gène en aval ne serait pas affectée par l'intégration du plasmide entier dans le chromosome. Par échange d'allèle, nous avons alors remplacé dans le mutant $\Delta vmpA::km$ le gène codant pour la résistance à la Kanamycine par le gène *vmpA* suivi du gène *cat*, codant pour la résistance au chloramphénicol, afin de pouvoir effectuer une sélection positive des clones obtenus.

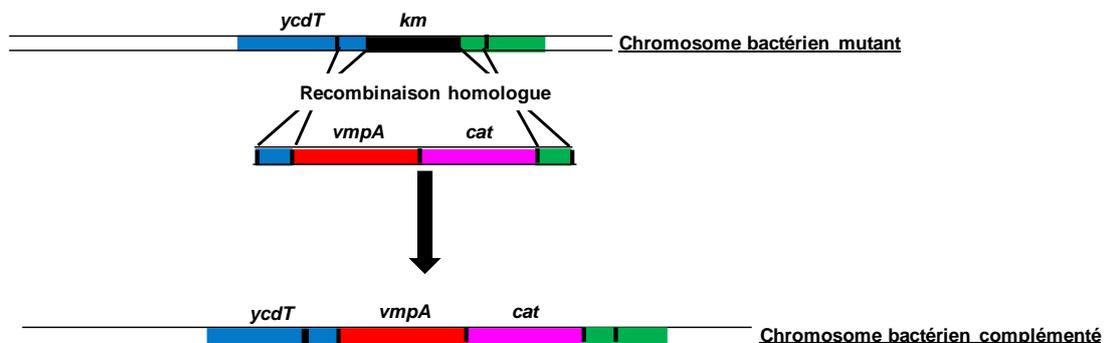


Figure 94 : Représentation schématique de la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$ par échange allélique.

La **Figure 94** représente schématiquement l'échange d'allèle effectué dans le mutant $\Delta vmpA::km$ pour la complémentation. Nous avons obtenu plusieurs mutants complémentés $\Delta vmpA::vmpA-cat$; nous avons regardé si la mobilité bactérienne était restaurée dans deux mutants complémentés sélectionnés (**Figure 95**).

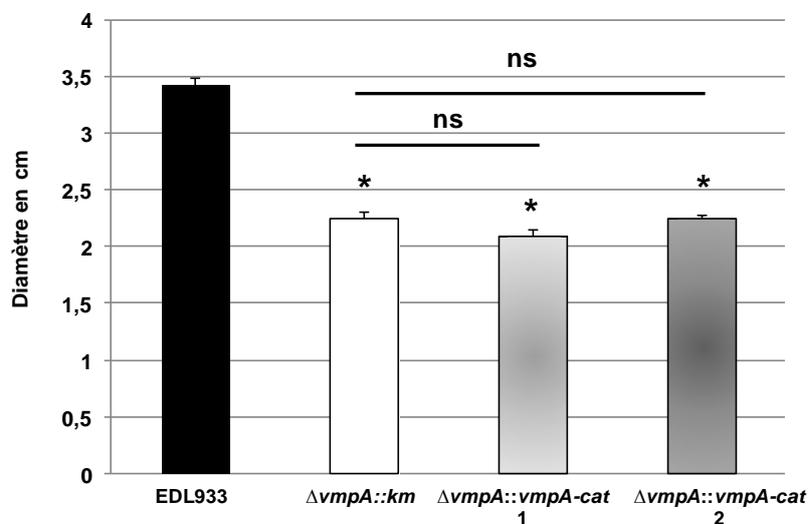


Figure 95 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, du mutant $\Delta vmpA::km$ et des deux mutants complémentés $\Delta vmpA::vmpA-cat$ 1 et 2 (n>4). * : $P<0.01$

La mobilité bactérienne observée dans la souche sauvage EDL933 n'est pas restaurée dans les deux souches complémentées $\Delta vmpA::vmpA-cat$ 1 et 2 (**Figure 95**). Suite à ces observations, nous avons décidé d'arrêter l'analyse phénotypique des deux clones du mutant complémenté.

Conclusion sur la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$

Nous avons essayé de compléter de différentes façons le mutant $\Delta vmpA::km$. Cependant, aucune des complémentations effectuées ne nous a permis de restaurer les phénotypes observés dans la souche sauvage. Nous en avons conclu que des mutations non désirées se sont probablement produites ailleurs dans le génome lors de la construction de ce mutant.

Analyse phénotypique du mutant transposon

Nous avons à disposition le mutant 115B5 dont le gène *vmpA* avait été inactivé par insertion d'un transposon lors de la construction de la banque de mutants avant mon arrivée au laboratoire. Nous n'avons pas utilisé ce mutant auparavant puisqu'il est préférable de travailler avec un mutant isogénique dans lequel le gène entier est délété. Face aux difficultés rencontrées

précédemment, nous avons décidé d'analyser les phénotypes du mutant 115B5 afin de les comparer à ceux de la souche sauvage et du mutant $\Delta vmpA::km$.

- Croissance bactérienne

La croissance bactérienne était affectée dans le mutant $\Delta vmpA::km$, nous avons donc analysé celle du mutant 115B5 (**Figure 96**).

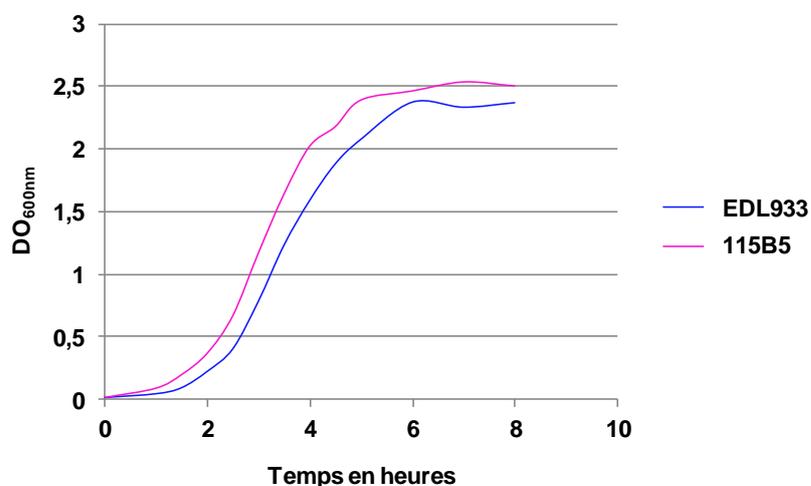


Figure 96 : Courbes de croissance en milieu LB de la souche sauvage EDL933 et du mutant 115B5.

Contrairement aux observations faites sur le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant 115B5 ne présente pas de retard de croissance comparativement à la souche sauvage (**Figure 96**).

- Mobilité

Comme le mutant $\Delta vmpA::km$, le mutant 115B5 présente un défaut de mobilité par rapport à la souche sauvage EDL933 (**Figure 97**).

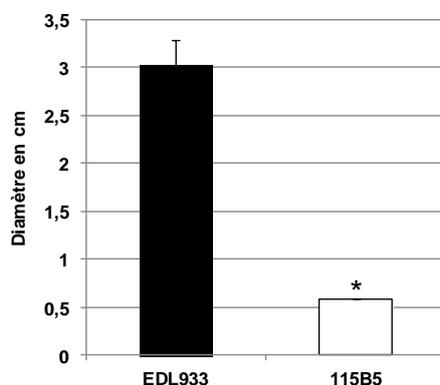


Figure 97 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933 et du mutant 115B5 de la banque de mutants (n=4).* : $P < 0.01$

- Formation de biofilm

Une très faible augmentation, non significative par le test *t* de Student, est observée dans le mutant 115B5 comparativement à la souche sauvage EDL933 (**Figure 98**).

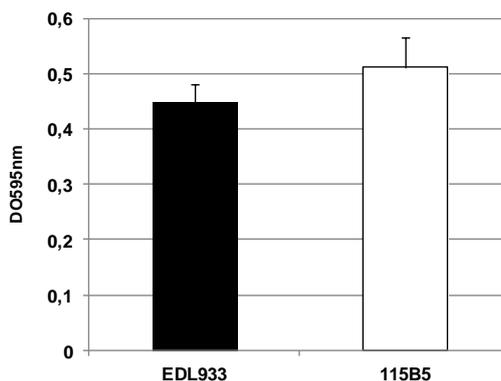


Figure 98 : Formation de biofilm par la souche sauvage EDL933 et le mutant 115B5 (n=7).

- Complémentation

Avant de poursuivre les analyses phénotypiques, nous avons complété le mutant 115B5 afin de voir si le défaut de mobilité observé dans le mutant était restauré. Afin de tester une complémentation en *trans*, nous avons cloné le gène *vmpA* dans le vecteur pBAD30 que nous avons introduit dans la souche sauvage EDL933 et dans le mutant 115B5. Nous avons obtenu des clones recombinants aussi bien dans la souche parentale EDL933 que dans le mutant 115B5.

Nous avons analysé l'expression du gène *vmpA* dans les souches suivantes : EDL933, EDL933 (p30*vmpA*) et le mutant complémenté 115B5 (p30*vmpA*) (**Figure 99**).

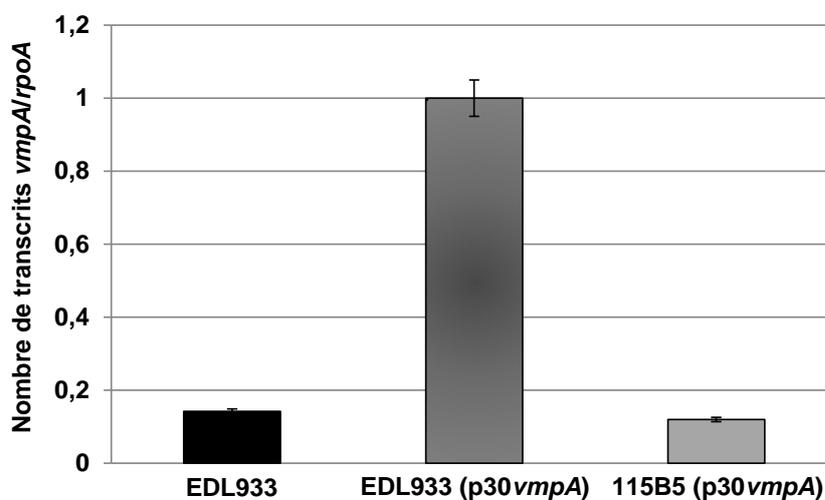


Figure 99 : Expression du gène *vmpA* dans les souches EDL933, EDL933 (p30*vmpA*) et le mutant complémenté 115B5(p30*vmpA*) en phase exponentielle de croissance en milieu LB supplémenté de 0.5 mM d'arabinose.

Le gène *vmpA* est surexprimé dans la souche sauvage hébergeant le plasmide recombinant p30*vmpA* comparativement à la souche sauvage (**Figure 99**). En revanche, l'expression de *vmpA* est identique dans le mutant complétementé 115B5(p30*vmpA*) et dans la souche sauvage EDL933. La raison pour laquelle *vmpA* n'est pas surexprimé dans le mutant 115B5(p30*vmpA*) alors qu'il est sous le contrôle du promoteur *para* comme dans la souche EDL933(p30*vmpA*) avec la même concentration d'arabinose n'est pas claire.

Nous avons ensuite analysé la mobilité des souches précédentes ainsi que du mutant 115B5 complétementé (**Figure 100**).

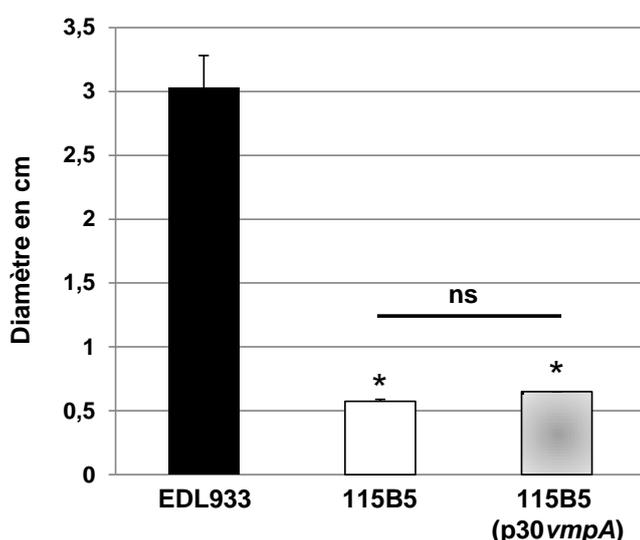


Figure 100 : Mobilité bactérienne de la souche sauvage EDL933, du mutant 115B5 et du mutant 115B5(p30*vmpA*) (n=4). * : $P < 0.01$

La complémentation du mutant 115B5 ne restaure pas la mobilité observée chez la souche sauvage (**Figure 100**).

Conclusions sur la complémentation du mutant $\Delta vmpA::km$

Le mutant $\Delta vmpA::km$ présente un défaut de croissance qui n'existe pas dans le mutant 115B5. De plus, la mobilité bactérienne n'est restaurée que partiellement dans le mutant $\Delta vmpA::km$ complétementé, et l'expression du LEE, de *gadE* et *gadX* n'est pas restaurée du tout. L'ensemble de ces résultats suggère que *vmpA* n'est pas le seul gène défaillant dans le mutant $\Delta vmpA::km$. Nous avons donc décidé de reconstruire un mutant isogénique pour le gène *vmpA*. Nous avons choisi la cassette de résistance au chloramphénicol et nous avons enlevé une portion plus importante que précédemment. D'autre part, une DGC et une PDE codées par des gènes transcrits en opéron sont très souvent impliquées dans les mêmes mécanismes bactériens (Tuckerman *et al.*, 2009). Nous avons à disposition le mutant EDL933 $\Delta ycdT::km$, que nous

avons complété par un vecteur recombinant à faible nombre de copies : pBAD30, contenant le gène *ycdT*. Nous avons donc analysé en parallèle du nouveau mutant $\Delta vmpA::cat$ les phénotypes du mutant $\Delta ycdT$ et de son complémenté.

3. Analyse du mutant $\Delta vmpA::cat$

Croissance du mutant $\Delta vmpA::cat$

Nous avons tout d'abord analysé la croissance du mutant $\Delta vmpA::cat$ (**Figure 101**).

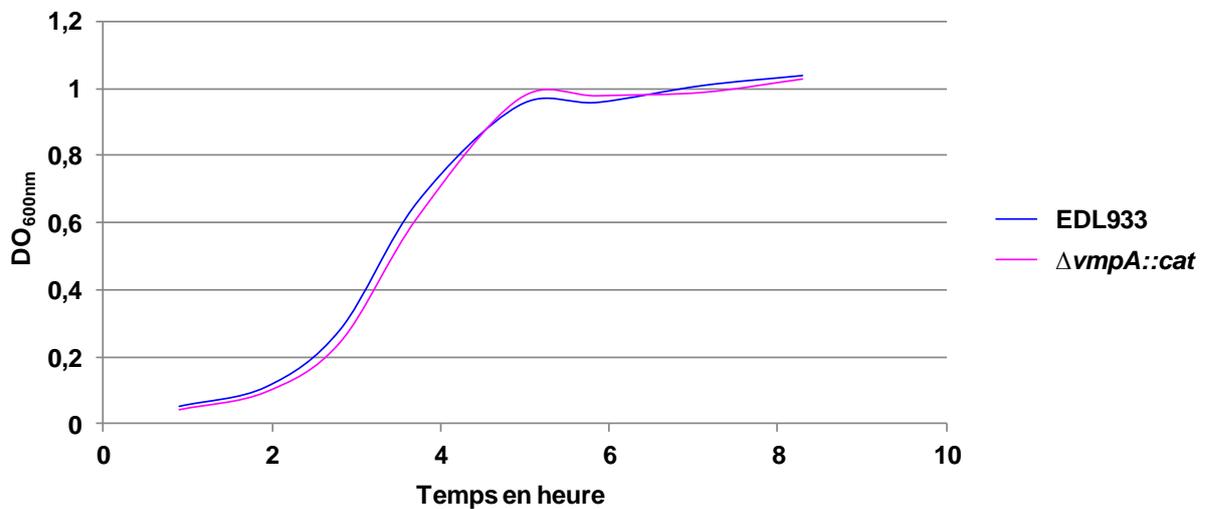


Figure 101 : Courbes de croissance de la souche sauvage EDL933 et du mutant $\Delta vmpA::cat$ en milieu LB.

Le mutant $\Delta vmpA::cat$, contrairement au mutant $\Delta vmpA::km$, ne présente pas de retard de croissance comparativement à la souche sauvage EDL933 (**Figure 101**). Nous avons par conséquent tenté de compléter ce nouveau mutant.

Complémentation du mutant $\Delta vmpA::cat$

Nous avons testé en parallèle deux stratégies de complémentation :

1. La première stratégie était l'introduction du vecteur recombinant *p30vmpA* dans le mutant $\Delta vmpA::cat$ (complémentation en *trans*).
2. La deuxième stratégie était de remplacer le gène *cat* par le gène *vmpA* sauvage suivi du gène *km* par échange d'allèle chromosomique (complémentation en *cis*).

Nous avons effectué les études phénotypiques sur les souches EDL933, EDL933(*p30vmpA*), EDL933(*p30ycdT*), $\Delta vmpA::cat$, $\Delta vmpA::cat$ (*p30vmpA*), $\Delta vmpA::vmpA-km$, $\Delta ycdT$ et $\Delta ycdT$ (*p30ycdT*).

Analyse phénotypique

- Mobilité bactérienne

Le premier phénotype que nous avons analysé est la mobilité bactérienne (**Figure 102**).

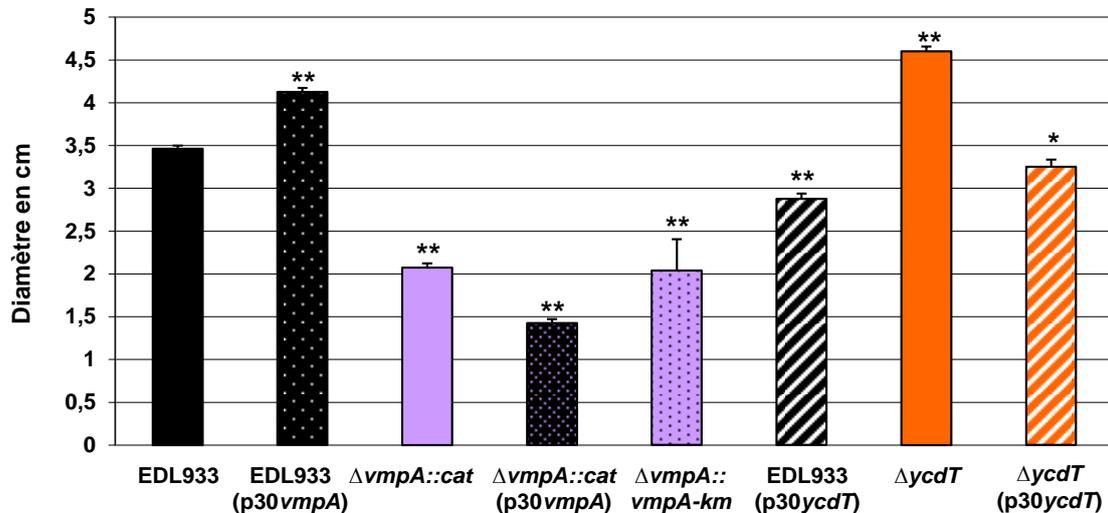


Figure 102 : Mobilité bactérienne des différentes souches sur milieu LB semi-solide à t=8 h (n=3).

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$.

La souche EDL933 qui surexprime *vmpA* est plus mobile que la souche sauvage, alors que le mutant $\Delta vmpA::cat$ présente un défaut de mobilité (**Figure 103**). Cependant, ni la complémentation en *cis* ni la complémentation en *trans* ne restaurent la mobilité. Ces résultats indiquent que VmpA favorise la mobilité, mais que l'inactivation de *vmpA* dans la souche EDL933 induit probablement d'autres mutations qui influent sur la mobilité. Ces mutations ne permettraient pas la restauration de ce phénotype lorsque l'on remplace *vmpA* dans le mutant.

La souche EDL933 qui surexprime *ycdT* présente un défaut de mobilité par rapport à la souche sauvage (**Figure 103**). Le mutant $\Delta ycdT$ est plus mobile que la souche sauvage et la complémentation du mutant $\Delta ycdT$ en *trans* permet la restauration du phénotype. Ces résultats indiquent que YcdT inhibe la mobilité bactérienne.

En conclusion, le di-GMPc inhibe la mobilité bactérienne de la souche EHEC O157:H7 EDL933.

- Formation de biofilm

Puis nous avons étudié la formation de biofilm (**Figure 103**).

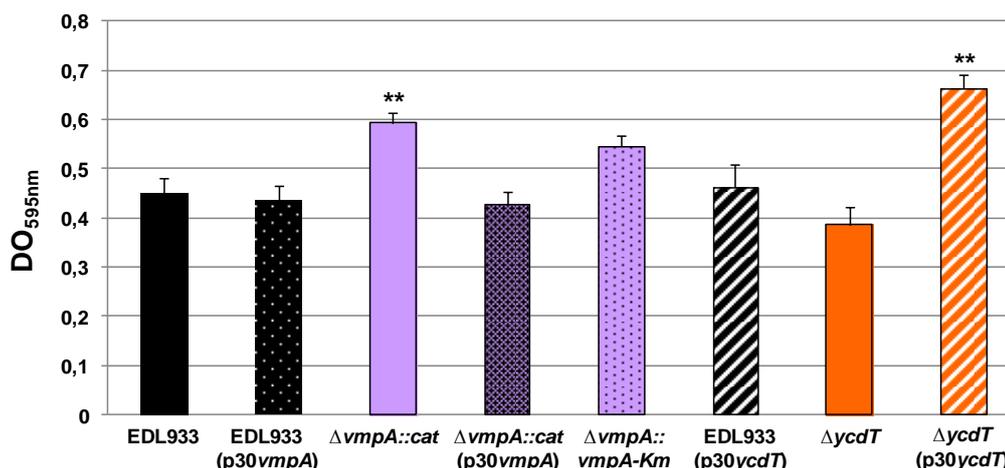


Figure 103 : Formation de biofilm par les différentes souches (n=7). * : $P < 0.05$

La formation de biofilm n'est pas diminuée dans la souche sauvage qui surexprime *vmpA* (**Figure 103**). En revanche, elle est augmentée dans le mutant $\Delta vmpA::cat$ et elle est restaurée dans le mutant complétementé en *cis* ($\Delta vmpA::cat(p30vmpA)$) et en *trans* ($\Delta vmpA::vmpA-km$). La formation de biofilm n'est pas altérée dans la souche sauvage qui surexprime *ycdT* ni dans le mutant $\Delta ycdT$. Cependant, la surexpression de *ycdT* dans le mutant complétementé $\Delta ycdT$ ($p30ycdT$) induit une formation de biofilm plus importante que dans la souche sauvage. Ces résultats indiquent que la formation de biofilm est inhibée par VmpA et activée par YcdT. Le di-GMPc active par conséquent la formation de biofilm par la souche EHEC O157:H7 EDL933.

- Régulation de l'expression du LEE

Nous avons analysé l'expression de *ler* et *espA* dans les différentes souches en milieu LB en phase exponentielle de croissance afin de voir si on retrouve dans le mutant $\Delta vmpA::cat$ la répression du LEE que l'on observait dans le mutant $\Delta vmpA::km$. Nous avons fait des qRT-PCR et les résultats sont donnés en relatif par rapport à l'expression de la souche sauvage EDL933.

Nous avons tout d'abord analysé l'expression de *ler* (**Figure 104**).

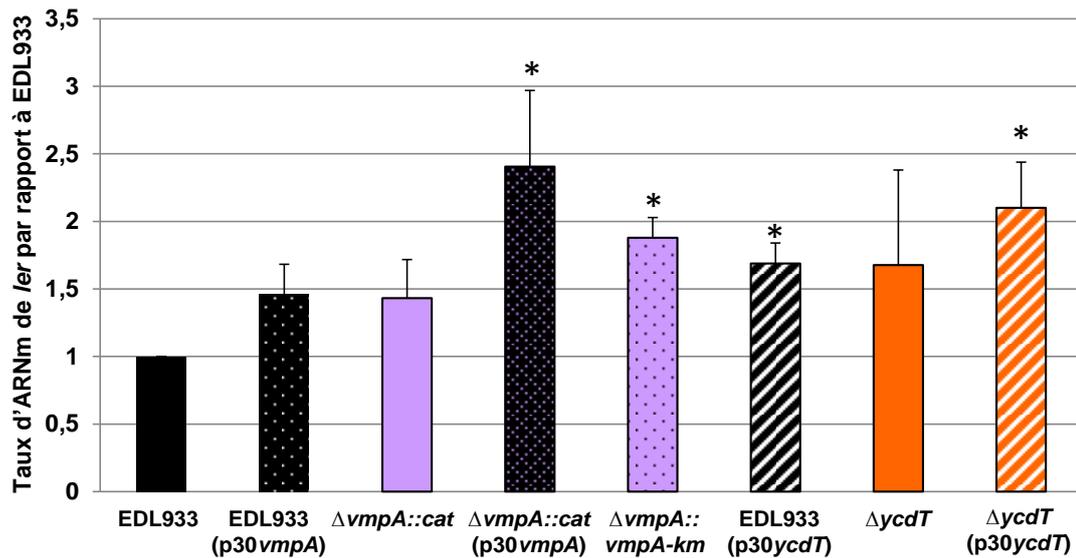


Figure 104 : Expression relative du gène *ler* dans les différentes souches (n=3). * : $P < 0.05$

L'expression de *ler* n'est pas affectée dans les mutants $\Delta vmpA::cat$ et $\Delta ycdT::km$ (**Figure 104**). Dans les souches EDL933(p30vmpA), $\Delta vmpA$ (p30vmpA), $\Delta vmpA::vmpA-km$, EDL933(p30ycdT) et $\Delta ycdT$ (p30ycdT), on augmente significativement l'expression de *ler* comparativement à la souche sauvage. Ce résultat est étonnant puisque VmpA est une PDE et YcdT une DGC, nous nous attendions donc à des résultats opposés.

Nous avons ensuite analysé l'expression de *espA* dans les différentes souches (**Figure 105**).

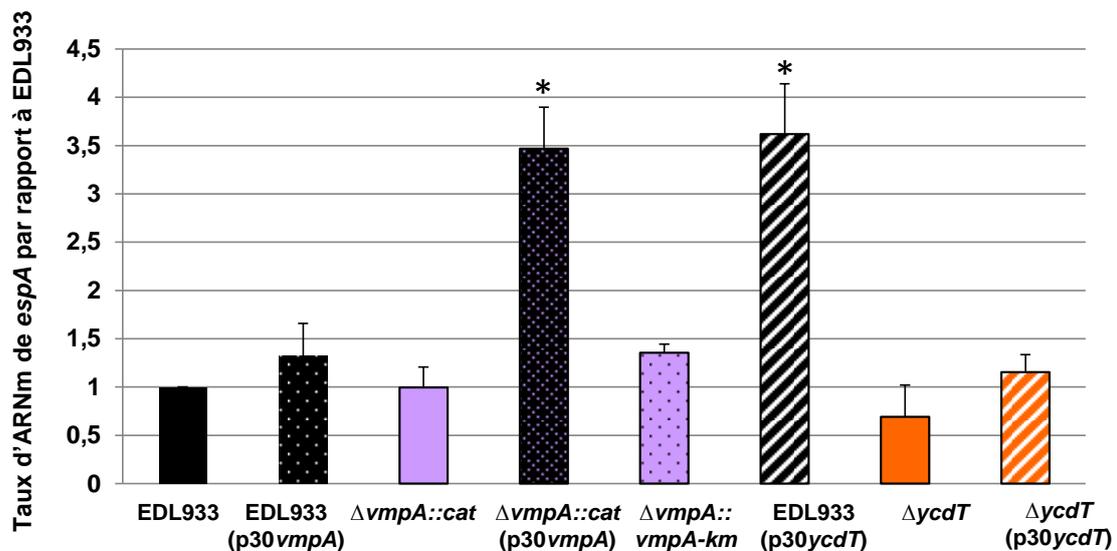


Figure 105 : Expression relative du gène *espA* dans les différentes souches (n=3). * : $P < 0.05$

La **Figure 105** montre que l'expression de *espA* est identique à l'expression observée dans la souche sauvage chez les souches EDL933 (p30*vmpA*), $\Delta vmpA::cat$, $\Delta vmpA::vmpA-km$, $\Delta ycdT::km$ et $\Delta ycdT::km$ (p30*ycdT*). On observe une augmentation de l'expression de *espA* dans les souches $\Delta vmpA$ (p30*vmpA*), et EDL933 (p30*ycdT*). La complémentation du mutant $\Delta vmpA::cat$ ainsi que la surexpression de *ycdT* dans la souche sauvage induit par conséquent une activation de l'expression de *espA*. De la même façon que pour l'expression de *ler*, l'activation de l'expression de *espA* lorsque *vmpA* ou *ycdT* est surexprimé est un résultat étonnant puisque VmpA et YcdT ont des activités opposées. On peut émettre l'hypothèse que la surexpression de *vmpA* ou de *ycdT* perturbe fortement la régulation de la concentration en di-GMPc dans la bactérie, de telle sorte que d'autres PDE ou DGC compenseraient ces activités afin de maintenir un taux de di-GMPc compatible avec la survie bactérienne. Que *vmpA* ou *ycdT* soit surexprimé, ce taux de di-GMPc serait sensiblement le même, et conduirait à l'activation de l'expression de *ler*. Afin de mieux comprendre ces résultats, il faudrait analyser l'expression de *ycdT* et *vmpA* dans les différentes souches. De plus, l'analyse de la concentration intracellulaire en di-GMPc dans les différentes souches étudiées pourrait également nous apporté des éléments importants sur la corrélation entre la concentration en di-GMPc et l'expression de *ler* et de *espA*.

En conclusion, nous avons démontré dans ce chapitre que le di-GMPc inhibe la mobilité bactérienne et favorise la formation de biofilm chez la souche EHEC O157:H7 EDL933. D'autre part, il semble la concentration en di-GMPc influence également l'expression du LEE.

Discussion et Perspectives

Le di-GMPc est un second messager bactérien impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires chez les bactéries. Chez certains pathogènes, son implication dans la virulence a déjà été décrite de nombreuses fois, et généralement une augmentation de la concentration en di-GMPc induit une diminution de la virulence. Cependant, le rôle du di-GMPc chez les *E. coli* pathogènes est peu connu, notamment chez le pathovar EHEC. Notre étude a identifié une nouvelle protéine à domaine EAL, VmpA, codée par le gène *z1528* (renommé *vmpA*), spécifique des souches EHEC les plus virulentes qui appartiennent au sérotype O157:H7. Le gène *vmpA* est situé dans l'îlot OI-47 spécifique des EHEC. Shen *et al.* (Shen *et al.*, 2005) ont étudié la distribution de l'îlot OI-47 chez différentes souches de STEC et ont également montré que *z1528* est associé aux souches d'EHEC les plus virulentes. En effet, leur étude a montré que cet îlot est présent chez toutes les souches EHEC de sérotype O157 testées, et seulement 5 souches non-O157 sur les 56 testées sont positives pour la présence du gène *z1528* (O132:NM, O113:NM, et 3 souches O145:NM) (Shen *et al.*, 2005).

Nos études *in vitro* et *in vivo* démontrent l'activité PDE de VmpA dans la souche EHEC O157:H7 EDL933. Notre étude montre également que VmpA est une PDE qui influence la concentration globale en di-GMPc contrairement à d'autres protéines DGC ou PDE. Cette observation est étonnante puisque l'analyse bioinformatique de la séquence protéique de VmpA montre un domaine transmembranaire, qui serait plutôt en accord avec une régulation de la concentration locale en di-GMPc (au niveau membranaire). Ce résultat suggère que VmpA est une PDE particulièrement active qui a une influence majeure sur la concentration en di-GMPc chez la souche EHEC EDL933. Nous avons également montré que l'activité de VmpA, qui conduit à une diminution de la concentration en di-GMPc, active la mobilité et inhibe la formation de biofilm. Elle semble aussi avoir une influence sur l'expression du LEE, un élément clé de la virulence. Ces résultats sont en accord avec ceux reportés dans la littérature pour différentes autres espèces bactériennes.

Le gène *vmpA* est situé dans l'îlot OI-47 absent du génome de la souche *E. coli* K-12 MG1655, et est situé en aval du gène *ycdT*, présent à la fois chez la souche *E. coli* K-12 et la souche EDL933. Le gène *ycdT* code pour une DGC fonctionnelle (Jonas *et al.*, 2008). Notre étude a montré que *ycdT* et *vmpA* sont transcrits en opéron. Cette observation suggère fortement que l'îlot OI-47 était présent chez l'ancêtre des souches *E. coli* K-12 et EHEC O157:H7. Cet îlot

aurait été délété chez les souches *E. coli* K-12. Les résultats phénotypiques des deux mutants isogéniques $\Delta vmpA::cat$ et $\Delta ycdT$ ainsi que des mutants complémentés montrent que VmpA et YcdT sont impliqués dans la régulation des mêmes mécanismes physiologiques. De plus, les prédictions de domaines protéiques ont montré que YcdT et VmpA possèdent tous deux des domaines transmembranaires. Ces observations sont en accord avec celles faites chez d'autres espèces bactériennes où deux gènes codant une DGC et une PDE transcrits en opéron codent généralement pour des protéines colocalisées et impliquées dans les mêmes mécanismes physiologiques (Hengge, 2009).

YcdT et VmpA sont impliqués dans la régulation de la formation de biofilm. On retrouve en amont de l'opéron *ycdT-vmpA*, transcrit de façon divergente, l'opéron *ycdSRQP*, qui code pour des homologues des protéines PgaABCD. Ces dernières constituent le polysaccharide synthétisé lors de la formation de biofilm chez *E. coli* K-12 (Wang *et al.*, 2004). Souvent, les régulateurs sont codés par des gènes adjacents à leurs séquences cibles. Nous n'avons pas analysé le rôle de YcdT et VmpA sur l'expression de l'opéron *ycdSRQP* ainsi que sur la mise en place du polysaccharide lors de la formation de biofilm. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que YcdT et VmpA influencent la production de biofilms chez la souche EHEC O157:H7 EDL933 en modulant la concentration en di-GMPc qui régulerait en conséquence la transcription de l'opéron *ycdSRQP* ou la synthèse des protéines du polysaccharide. La régulation de la formation de biofilm par YcdT a été étudiée chez la souche *E. coli* K-12 MG1655, et ni la formation de biofilm ni l'expression de l'opéron *pga* ne sont altérés dans un mutant délété pour le gène *ycdT* (Jonas *et al.*, 2008). Cependant, le gène *vmpA* n'est pas présent dans la souche *E. coli* K-12 MG1655. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses :

- La première hypothèse serait que lors de la délétion de l'ilôt OI-47, des régulations de la synthèse ou de l'activité de YcdT se soient mises en place et que la protéine YcdT de la souche *E. coli* K-12 MG1655 n'ait plus la même fonction que celle de la souche EHEC EDL933. De plus, chez *E. coli* K-12 souche MG1655, la protéine YcgF possède un domaine EAL dont la fonction dans la dégradation du di-GMPc n'a pas encore été prouvée (Tschowri *et al.*, 2009). Cependant, YcgF est impliquée indirectement dans la formation de biofilm, et cette protéine est absente de la souche EHEC EDL933. Il est par conséquent possible que la formation de biofilm soit régulée de façon différente dans la souche MG1655 et dans la souche EDL933, *via* YcgF et YcdT.

- La deuxième hypothèse serait que YcdT aurait un rôle moins important que VmpA dans la régulation de la mise en place du polysaccharide. Cette dernière hypothèse est en accord avec nos résultats puisque dans le mutant $\Delta vmpA::cat$ on augmente de 1.3 fois la production de biofilms comparativement à la souche sauvage alors que la délétion de *ycdT* n'a aucun effet.

Afin de déterminer le rôle de YcdT et de VmpA dans la mise en place du polysaccharide il serait intéressant d'étudier le rôle de YcdT et VmpA dans la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de l'opéron *ycdSRQP* chez les EHEC O157:H7.

Il est important de noter que dans la souche sauvage qui surexprime *vmpA*, la formation de biofilm n'est pas diminuée comparativement à la souche sauvage, alors que la surexpression de *vmpA* dans le mutant $\Delta vmpA::cat$ restaure le phénotype sauvage. Cependant la formation de biofilm par la souche sauvage est très faible dans nos conditions de culture, et s'apparente probablement à un bruit de fond que la sensibilité de notre méthode ne permet pas de voir diminuer. Il est également possible que l'activité de DGC permette de compenser une diminution trop importante de la concentration en di-GMPc due à la surexpression de *vmpA*, diminution qui serait létale pour la bactérie.

Nous avons également montré que VmpA et YcdT contrôlent la mobilité de EDL933. Cependant, bien que les différents mutants pour le gène *vmpA* présentent tous un défaut de mobilité, leur complémentation n'a jamais permis de restaurer la mobilité bactérienne de la souche sauvage. Mais la surexpression de *vmpA* dans la souche sauvage indique que la protéine VmpA est bien impliquée dans la mobilité bactérienne de EDL933. Ces résultats, ainsi que les difficultés rencontrées lors des tests de complémentation, suggèrent fortement que lorsque l'on délète le gène *vmpA* une ou plusieurs mutations compensatoires ont lieu ailleurs dans le génome d'EDL933 afin d'assurer la survie cellulaire. Des mutations suppressives ont déjà été décrites lors de la mutation de gènes codant pour des régulateurs pléiotropes qui ciblent directement ou indirectement de nombreux gènes impliqués dans la physiologie bactérienne et la virulence, comme par exemple le gène *hfq* (Shakhnovich *et al.*, 2009) ou le gène *rpoE* (Button *et al.*, 2007). L'émergence de mutations secondaires dans les différents mutants pour le gène *vmpA* suggère que : (i) Soit VmpA est un régulateur global de la physiologie des *E. coli* O157:H7 et sa mutation compromet la croissance bactérienne, (ii) soit en absence de VmpA, la localisation locale ou globale en di-GMPc chez les EHEC O157:H7 est trop élevée et atteint des concentrations toxiques qui seraient létales en absence de mutations compensatoires. Il a déjà été

décrit que des concentrations en di-GMPc trop élevées peuvent être létales pour certaines souches d'*E. coli* (Ryjenkov *et al.*, 2005). D'autre part, la mobilité observée chez le mutant $\Delta ycdT$ est restaurée dans le mutant complémenté $\Delta ycdT$ (p30 $ycdT$). Ces résultats suggèrent que VmpA jouerait un rôle plus important que YcdT dans la physiologie bactérienne, puisque la délétion de ce dernier n'engendre pas de mutations compensatoires qui affectent la mobilité bactérienne.

Les résultats obtenus concernant l'influence de YcdT et VmpA sur l'expression du LEE sont moins clairs et semblent quelquefois contradictoires. La surexpression de l'un ou l'autre gène exerce le même effet sur l'expression de *ler* et *espA*, alors qu'on s'attendrait à un effet opposé, puisque les protéines ont des activités opposées, et de plus cet effet dépend du background cellulaire. Cependant, VmpA et YcdT ne sont pas les seules PDE et DGC actives dans la cellule, et on peut supposer que toute perturbation importante de l'activité de l'une d'entre elles a des répercussions sur l'activité des autres, afin que la concentration locale ou globale de di-GMPc soit maintenue à un taux compatible avec les processus physiologiques et la survie bactérienne. Pour mieux comprendre le rôle de VmpA et YcdT sur l'expression du LEE, il serait nécessaire de pousser plus loin les investigations en dosant le di-GMPc et en quantifiant l'expression de *ycdT* et *vmpA*, voire des autres gènes codant les autres PDE et DGC de la cellule, dans les différentes souches de notre étude. L'analyse de la sécrétion des protéines par le SSTT et de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales apporterait certainement un éclairage complémentaire et permettrait de confirmer ou réfuter l'influence du di-GMPc sur l'expression du LEE.

Il serait intéressant de rechercher les gènes mutés dans les différents mutants *vmpA*, et de caractériser le rôle de leur produit dans la mobilité ou plus largement dans la physiologie bactérienne. En effet, les résultats décrits dans ce chapitre montrent que certains phénotypes sont différents d'un mutant $\Delta vmpA$ à un autre, comme par exemple la croissance bactérienne (dans le mutant $\Delta vmpA::km$), la formation de biofilm (dans le mutant 115B5) ou la régulation de l'expression du LEE (dans les mutants $\Delta vmpA::km$ et $\Delta vmpA::cat$). Ceci suggère fortement que la ou les mutations compensatoires qui ont eu lieu dans les différents mutants sont différentes et ne concernent pas que la mobilité. Les relations entre ces gènes, codant probablement pour des régulateurs de la concentration en di-GMPc, et les phénotypes altérés seraient également à

explorer afin de mieux connaître le rôle du di-GMPc dans la physiologie et la virulence des EHEC.

Discussion générale

Les EHEC sont des pathogènes portés principalement par le bovin, responsables de toxico-infections alimentaires. De nombreuses épidémies dans le monde sont régulièrement recensées, et les infections à EHEC engendrent des symptômes qui peuvent conduire à des pathologies rares mais graves, le SHU et le PTT. Le SHU affecte principalement les jeunes enfants et provoque des atteintes rénales laissant souvent des séquelles à vie. Aucune thérapie contre les infections à EHEC n'est disponible à ce jour. L'utilisation d'antibiotiques est contre indiquée puisqu'elle augmenterait les risques de SHU ou PTT. Malgré l'existence de techniques de détection des EHEC, des aliments contaminés se retrouvent régulièrement sur le marché. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie des EHEC ainsi que la relation EHEC-cellules épithéliales humaines afin de proposer des stratégies thérapeutiques qui empêcheraient l'adhésion des bactéries dans l'intestin de l'Homme. C'est dans cette thématique que s'est inscrit mon travail de thèse. La faible dose infectieuse des EHEC est expliquée par une résistance accrue à l'acidité, qui favoriserait la survie des EHEC dans l'estomac. Une fois arrivés dans l'intestin où le pH se rapproche de la neutralité, les EHEC répriment les mécanismes de résistance à l'acidité et activent le système d'adhésion aux cellules épithéliales qui leur permet de coloniser l'intestin et de déstabiliser la barrière intestinale.

Le NO est un agent antibactérien produit notamment par les cellules épithéliales intestinales lors d'une inflammation. Des études préliminaires au laboratoire avaient permis de montrer que la présence de NO endogène aussi bien qu'exogène inhibe l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales. Cette inhibition de l'adhésion s'accompagne de l'activation de l'expression de *gadE* et *gadX* codant les activateurs principaux de la résistance à l'acidité, et de l'inhibition de l'expression du LEE, qui code pour le SSTT et plusieurs protéines effectrices impliquées dans l'adhésion (Vareille, 2008). Notre étude a permis de déterminer la cascade de régulation de *gadE*, *gadX* et du LEE par le NO, qui fait intervenir le régulateur principal de la réponse au NO chez les *E. coli* : NsrR. Lors d'une infection à EHEC, les bactéries arrivent tout d'abord dans l'estomac et activent l'expression de *gadE* et *gadX*, qui activent l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de résistance à l'acidité et répriment l'expression du LEE. Cette répression permet aux bactéries d'économiser l'énergie nécessaire à la synthèse et la mise en place du SSTT et empêche la colonisation des EHEC dans un environnement défavorable. Une fois les bactéries arrivées dans l'intestin, le SSTT et les protéines effectrices sont synthétisés, notamment *via* l'activation de l'expression du LEE par différents facteurs environnementaux. Suite à cette infection, le système immunitaire de l'Homme met en place la

réponse immunitaire innée ; en particulier, la iNOS des cellules épithéliales intestinales est induite, et ces dernières produisent du NO à partir de L-arginine (Suchner *et al.*, 2000). Le NO inhibe l'expression et la synthèse de Stx (Vareille, 2008) et inhibe l'expression du LEE, notamment *via* NsrR. Afin de confirmer le rôle du NO sur la virulence des EHEC, il serait intéressant d'utiliser un modèle murin invalidé pour la iNOS et d'analyser dans ce modèle la colonisation des EHEC, l'adhésion sur les cellules épithéliales intestinales, et la synthèse de Stx. Si ces analyses *in vivo* confirment le rôle du NO dans la virulence des EHEC, le NO serait une piste d'étude intéressante dans la recherche de thérapies contre les infections à EHEC. En effet, contrairement à l'administration d'antibiotiques, les résultats obtenus précédemment au laboratoire montrent que, *in vitro*, le NO inhibe la synthèse de Stx chez les EHEC. L'augmentation de la production de NO chez des patients infectés pourrait être envisagée afin d'inhiber la production de Stx et l'adhésion des EHEC dans l'intestin. Cependant, le NO est un radical libre, il est donc important qu'il ne soit pas administré ou produit en trop forte quantité, afin de ne pas induire une réponse inflammatoire exacerbée au niveau intestinal qui engendrerait une déstabilisation de la barrière intestinale et un passage facilité de la Stx dans le sang.

L'augmentation de la concentration en NO dans la lumière intestinale chez un patient infecté par des EHEC pourrait être réalisée de différentes façons. Les muqueuses intestinales des patients infectés par les EHEC produisent la iNOS. La iNOS a comme substrat l'arginine, qu'elle partage avec l'arginase. Augmenter la quantité d'arginine présente dans l'environnement intestinal pourrait favoriser l'activité iNOS au détriment de l'arginase et permettrait une augmentation de la concentration en NO. En effet, il a été montré que l'administration d'arginine à des souris infectées par *Citrobacter rodentium* augmente la concentration plasmatique en NO (Gobert *et al.*, 2004). D'autre part, des donneurs de NO sont souvent utilisés en médecine cardiaque et vasculaire. L'administration d'un donneur de NO à des patients infectés par des EHEC pourrait, en concentration physiologique, empêcher les EHEC d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales et inhiber la synthèse de la Stx. On peut également envisager l'administration d'un probiotique qui produirait un composé empêchant l'adhésion des EHEC en produisant du NO. En effet, certaines bactéries possèdent des gènes codant pour des protéines homologues à la iNOS des eucaryotes et seraient susceptibles de produire du NO dans le côlon (Crane *et al.*, 2010).

L'activation des mécanismes de résistance à l'acidité par le NO est un résultat intéressant au regard des contaminations à EHEC inter-humaines. En effet, le NO libéré par les entérocytes lors de l'infection induit l'expression de *gadE* et *gadX*, et donc active les mécanismes de résistance à l'acidité lors du passage des EHEC dans l'intestin. Ceci limite l'adhésion des EHEC aux cellules intestinales, mais favorise leur excréation fécale et leur dissémination dans l'environnement. En accord avec ceci il a été souvent observé que les EHEC ne sont pas de très bons colonisateurs du tube digestif, ne persistant pas très longtemps chez l'Homme, de telle sorte que lorsque les symptômes du SHU apparaissent les coprocultures sont bien souvent négatives. Lorsque les EHEC sont excrétés et ingérés par d'autres individus, les mécanismes de résistance à l'acidité sont ainsi déjà mis en place et favorisent la survie des EHEC dans le compartiment gastrique et donc leur arrivée dans l'intestin, puis le développement d'une épidémie.

L'ingestion d'aliments contaminés n'induit pas les mêmes symptômes chez différentes personnes. En effet, la plupart des patients infectés qui développent un SHU sont majoritairement de jeunes enfants. De nombreuses études ont montré que le développement d'une pathologie grave à la suite d'une infection à EHEC est multifactoriel. Le nombre de récepteurs à la toxine ainsi que leur localisation est un premier facteur de l'hôte déterminant le développement d'un SHU chez un patient infecté. Ensuite, la réponse inflammatoire lors d'infections à EHEC est un facteur clé dans le développement de l'infection. Lors d'une infection microbienne, il est important de développer une réponse inflammatoire modérée qui produise des agents antibactériens tels que le NO par exemple, mais pas exacerbée afin de ne pas détruire ses propres cellules et favoriser un terrain d'infection. Or, les patients atteints de SHU ont une concentration en cytokines pro-inflammatoires plus importante que les patients infectés qui ne développent pas de SHU, ces observations étant associées à une inflammation du côlon qui favorise le passage de la Stx vers la circulation sanguine (Westerholt *et al.*, 2000). D'autre part, la composition du microbiote intestinal du patient pourrait jouer un rôle important dans l'apparition des symptômes. En effet, il a été montré au laboratoire que certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal induisent la synthèse de Stx alors que d'autres la répriment (de Sablet *et al.*, 2009). Un déséquilibre du microbiote intestinal en faveur des unes ou des autres de ces espèces pourrait donc favoriser ou au contraire limiter le développement du SHU.

Plusieurs études ont mis en évidence que le NO peut moduler l'expression ou l'activité des DGC et/ou PDE impliquées dans le métabolisme du di-GMPc (Barraud *et al.*, 2009 ; Carlson *et*

al., 2010). Le NO à faible concentration inhibe la synthèse du di-GMPc et favorise en conséquence la dispersion et la virulence de la bactérie pathogène étudiée (Barraud *et al.*, 2009 ; Carlson *et al.*, 2010). L'identification de VmpA, une PDE spécifique des souches d'EHEC les plus pathogènes, ainsi que l'analyse transcriptomique globale effectuée au préalable, nous ont amenés à rechercher le lien entre la régulation du LEE par le NO et le di-GMPc. En effet, nous avons montré que NsrR active directement l'expression du LEE, mais qu'il réprime l'expression de *gadE* et *gadX* indirectement. Il existe donc un intermédiaire qui peut être un régulateur dont l'activité serait modifiée par la concentration en di-GMPc dégradé par VmpA. Les résultats obtenus et les difficultés rencontrées pour cette deuxième partie d'étude ne nous ont pas permis d'établir le rôle de VmpA sur l'adhésion des EHEC O157:H7. En retour, le di-GMPc peut influencer la production de NO chez l'hôte. En effet, il a été montré que l'augmentation de la concentration en di-GMPc produit par *Klebsiella pneumoniae* induit une augmentation de la production de NO par les cellules épithéliales pulmonaires chez des souris infectées (Karaolis *et al.*, 2007). VmpA est une PDE spécifique des sérotypes d'EHEC les plus virulents. Nous n'avons pas démontré clairement l'implication de VmpA dans la régulation de l'expression du LEE. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activité de VmpA diminue la production de di-GMPc chez les EHEC dans l'intestin, afin d'empêcher qu'une trop forte concentration en di-GMPc n'induit la production de NO et donc inhibe l'adhésion et la synthèse de Stx. Des recherches plus approfondies sur ce sujet doivent être effectuées afin de savoir s'il existe réellement un lien entre VmpA et la production de NO. Cibler VmpA pourrait alors être une voie de recherche de thérapies contre les infections à EHEC. L'administration d'un probiotique produisant du di-GMPc pourrait également permettre la production de NO *in situ*, au niveau des cellules épithéliales intestinales.

Notre étude a permis d'explorer deux volets de la physiologie des EHEC O157:H7. L'étude de l'effet du NO dans la physiologie des EHEC ouvre des voies de recherche plus appliquées qui permettraient de cibler l'adhésion des EHEC O157:H7. De plus, la formation de biofilm est un élément important dans la persistance des EHEC dans les abreuvoirs d'élevages bovins, les abattoirs et les ateliers de transformation des aliments. L'analyse du rôle du di-GMPc dans la formation de biofilm chez les EHEC O157:H7 est ainsi un volet important dans la lutte contre la contamination du réservoir bovin et de la chaîne alimentaire.

Liste des publications et communications

1. Publications

Sur le travail de thèse

The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K-12 strains affects motility and biofilms formation in the enterohemorrhagic O157:H7 serotype.

Branchu P, Hindré T, Fang X, Thomas R, Gomelsky M, Claret L, Harel J, Gobert A P, Martin C. *Veterinary of Immunology and Immunopathology*, accepté, disponible sur internet : doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.029

NsrR, GadE and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide.

Branchu P, Vareille M, Crépin S, Harel J, Durand A, Gobert A P, Martin C. *En révision pour publication dans Molecular Microbiology*.

Sur le travail de master I

Genomic matrix attachment region and chromosome conformation capture quantitative real time PCR assays identify novel putative regulatory elements at the imprinted *Dlk1/Gtl2 locus*.

Braem C, Recolin B, Rancourt RC, Angiolini C, Barthès P, Branchu P, Court F, Cathala G, Ferguson-Smith AC, Forné T. *The journal of biological chemistry*, 2008. (Volume: 283- No 27- p18612-18620)

2. Communications

Communications orales

Nitric oxide inhibits adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial intestinal cells. 2011 *E. coli* and the mucosal immune system (ECMIS), Ghent. Priscilla BRANCHU

Nitric oxide inhibits adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial intestinal cells. 2011 Cross-talk Lessons from host-pathogens interactions, Milan. Priscilla BRANCHU

Le monoxyde d'azote inhibe l'adhésion des EHEC O157:H7 aux cellules épithéliales intestinales. 2011 Journées de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé, Clermont-Ferrand. Priscilla BRANCHU

Le monoxyde d'azote inhibe l'adhésion des EHEC O157:H7 aux cellules épithéliales intestinales. 2011 Journée des microbiologistes du pôle clermontois, Clermont-Ferrand. Priscilla BRANCHU

Rôle du di-GMP cyclique dans la virulence des *Escherichia coli* entérohémorragiques O157:H7. 2009 Journée de la recherche, Clermont-Ferrand. Priscilla Branchu

Communications affichées

Rôle du di-GMP cyclique dans la virulence des *Escherichia coli* entérohemorragiques O157:H7. 2010 Journée des microbiologistes de l'INRA, Poitiers. Priscilla BRANCHU, Thomas HINDRE, Alain P GOBERT et Christine MARTIN.

Cyclic-di-GMP controls *Escherichia coli* O157:H7 virulence. 11-13 mai 2009 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – producing *Escherichia coli* infections (VTEC 2009). Buenos Aires (Argentine). Christine MARTIN, Thomas HINDRE, Josée HAREL, Anthony Leyme, **Priscilla BRANCHU**, Alain P. GOBERT.

Cyclic-Di-GMP controls *Escherichia coli* O157:H7 virulence. 2009 2^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand. Priscilla BRANCHU, Thomas HINDRE, Josée HAREL, Anthony LEYME, Alain P. GOBERT, Christine MARTIN.

Conférence sur invitation

Incidence des *Escherichia coli* entérohéorragiques dans l'alimentation. Septembre 2011 et septembre 2012, AgroParisTech, Massy.

Références bibliographiques

- Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T. & Tobe, T. (2008).** Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res* **15**, 25-38.
- Almeida, C. C., Romao, C. V., Lindley, P. F., Teixeira, M. & Saraiva, L. M. (2006).** The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *J Biol Chem* **281**, 32445-32450.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3-6.
- Andreoli, S. P., Trachtman, H., Acheson, D. W., Siegler, R. L. & Obrig, T. G. (2002).** Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* **17**, 293-298.
- Bae, S. O., Sugano, Y., Ohi, K. & Shoda, M. (2004).** Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 315-322.
- Baptista, J. M., Justino, M. C., Melo, A. M., Teixeira, M. & Saraiva, L. M. (2012).** Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted by *E. coli* flavorubredoxin. *J Bacteriol*.
- Barbaree, J., M. & Payne, W., J. (1967).** Products of denitrification by a marine bacterium as revealed by gas chromatography. *Marine Biol* **1**, 36-39.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009).** Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333-7342.
- Beaumont, H. J., van Schooten, B., Lens, S. I., Westerhoff, H. V. & van Spanning, R. J. (2004).** *Nitrosomonas europaea* expresses a nitric oxide reductase during nitrification. *J Bacteriol* **186**, 4417-4421.
- Bender, J. K., Praszker, J., Wakefield, M. J., Holt, K., Tauschek, M., Robins-Browne, R. M. & Yang, J. (2012).** Involvement of PatE, a prophage-encoded AraC-like regulator, in the transcriptional activation of acid-resistance pathways of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain EDL933. *Appl Environ Microbiol*.
- Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A. & Rosenshine, I. (2005).** Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 349-357.
- Beyhan, S., Tischler, A. D., Camilli, A. & Yildiz, F. H. (2006).** Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J Bacteriol* **188**, 3600-3613.

- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Ryjenkov, D. A. & other authors (2011).** Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilms formation and virulence in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **79**, 533-551.
- Bodenmiller, D. M. & Spiro, S. (2006).** The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **188**, 874-881.
- Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F. & other authors (2009).** Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilms induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* **72**, 1500-1516.
- Botsford, J. L. & Harman, J. G. (1992).** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**, 100-122.
- Boyd, E. F. & Hartl, D. L. (1998).** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol* **180**, 1159-1165.
- Brown, B. M. & Sauer, R. T. (1993).** Assembly of the Arc repressor-operator complex: cooperative interactions between DNA-bound dimers. *Biochemistry* **32**, 1354-1363.
- Brown, C. A., Harmon, B. G., Zhao, T. & Doyle, M. P. (1997).** Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol* **63**, 27-32.
- Brunelli, L., Crow, J. P. & Beckman, J. S. (1995).** The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **316**, 327-334.
- Brunton, J., Miller, V. L., Kaper, J. B., Portnoy, D. A. & Isberg, R. R. (1994).** Molecular biology and role in disease of the verotoxins (Shiga-like toxins) of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*, 391-404.
- Bush, M., Ghosh, T., Tucker, N., Zhang, X. & Dixon, R. (2010).** Nitric oxide-responsive interdomain regulation targets the sigma54-interaction surface in the enhancer binding protein NorR. *Mol Microbiol* **77**, 1278-1288.
- Bussiere, F. I., Chaturvedi, R., Cheng, Y. & other authors (2005).** Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem* **280**, 2409-2412.
- Bustamante, V. H., Villalba, M. I., Garcia-Angulo, V. A., Vazquez, A., Martinez, L. C., Jimenez, R. & Puente, J. L. (2011).** PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **82**, 398-415.
- Button, J. E., Silhavy, T. J. & Ruiz, N. (2007).** A suppressor of cell death caused by the loss of sigmaE downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 1523-1530.
- Cabello, P., Pino, C., Olmo-Mira, M. F., Castillo, F., Roldan, M. D. & Moreno-Vivian, C. (2004).** Hydroxylamine assimilation by *Rhodobacter capsulatus* E1F1. requirement of the *hcp*

gene (hybrid cluster protein) located in the nitrate assimilation *nas* gene region for hydroxylamine reduction. *J Biol Chem* **279**, 45485-45494.

Campellone, K. G. & Leong, J. M. (2003). Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol* **6**, 82-90.

Campellone, K. G. (2010). Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *FEBS J* **277**, 2390-2402.

Cannon, R. O., 3rd (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* **44**, 1809-1819.

Carlson, H. K., Vance, R. E. & Marletta, M. A. (2010). H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilms formation in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*.

Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. & Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3525-3535.

Castanie-Cornet, M. P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P. & Gutierrez, C. (2010). Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Res* **38**, 3546-3554.

Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. & Jenal, U. (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281**, 32015-32024.

Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**, 30829-30837.

Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M. & Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**, 33275-33283.

Clarke, M. B., Hughes, D. T., Zhu, C., Boedeker, E. C. & Sperandio, V. (2006). The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10420-10425.

Cobbold, R. N., Hancock, D. D., Rice, D. H., Berg, J., Stilborn, R., Hovde, C. J. & Besser, T. E. (2007). Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1563-1568.

Cooper, C. E. (1999). Nitric oxide biochemistry. *Biophys Acta* **1411**, 217-488.

Cornick, N. A. & Vukhac, H. (2008). Indirect transmission of *Escherichia coli* O157:H7 occurs readily among swine but not among sheep. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2488-2491.

- Crack, J., Green, J. & Thomson, A. J. (2004).** Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**, 9278-9286.
- Crack, J. C., Le Brun, N. E., Thomson, A. J., Green, J. & Jervis, A. J. (2008).** Reactions of nitric oxide and oxygen with the regulator of fumarate and nitrate reduction, a global transcriptional regulator, during anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **437**, 191-209.
- Crane, B. R., Sudhamsu, J. & Patel, B. A. (2010).** Bacterial nitric oxide synthases. *Annu Rev Biochem* **79**, 445-470.
- Crane, J. K., McNamara, B. P. & Donnenberg, M. S. (2001).** Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 197-211.
- Cray, W. C., Jr. & Moon, H. W. (1995).** Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1586-1590.
- Crepin, V. F., Prasannan, S., Shaw, R. K., Wilson, R. K., Creasey, E., Abe, C. M., Knutton, S., Frankel, G. & Matthews, S. (2005).** Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol Microbiol* **55**, 1658-1670.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M. N., Scott, C., Thomson, A. J., Green, J. & Poole, R. K. (2002).** NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J* **21**, 3235-3244.
- D'Autreaux, B., Tucker, N. P., Dixon, R. & Spiro, S. (2005).** A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**, 769-772.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P. V., Bae, N., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. (2008).** Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biol* **6**, e67.
- de Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A. P. & Martin, C. (2009).** Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **77**, 783-790.
- Delahay, R. M., Knutton, S., Shaw, R. K., Hartland, E. L., Pallen, M. J. & 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.
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S. & other authors (2004).** Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3597-3602.

- Dipineto, L., Santaniello, A., Fontanella, M., Lagos, K., Fioretti, A. & Menna, L. F. (2006).** Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Lett Appl Microbiol* **43**, 293-295.
- Dong, T. & Schellhorn, H. E. (2009).** Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics* **10**, 349.
- Dziva, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Smith, A. J. & Wallis, T. S. (2004).** Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **150**, 3631-3645.
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Huber, R., Kroneck, P. M. & Neese, F. (2002).** Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome *c* nitrite reductase. *J Am Chem Soc* **124**, 11737-11745.
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Giron, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., Hutcheson, S. W., McDaniel, T. K. & Kaper, J. B. (2000).** The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**, 6115-6126.
- Eriksson, E., Nerbrink, E., Borch, E., Aspan, A. & Gunnarsson, A. (2003).** Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the Swedish pig population. *Vet Rec* **152**, 712-717.
- Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguenec, C. & Denamur, E. (2004).** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**, 1085-1094.
- Fang, F. C. (2004).** Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**, 820-832.
- Fang, X. & Gomelsky, M. (2010).** A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* **76**, 1295-1305.
- Fileiko, N., Spiro, S., Browning, D. F., Squire, D., Overton, T. W., Cole, J. & Constantinidou, C. (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.
- Flockhart, A. F., Tree, J. J., Xu, X. & other authors (2012).** Identification of a novel prophage regulator in *Escherichia coli* controlling the expression of type III secretion. *Mol Microbiol* **83**, 208-223.
- Foster, G., Evans, J., Knight, H. I., Smith, A. W., Gunn, G. J., Allison, L. J., Synge, B. A. & Pennycott, T. W. (2006).** Analysis of feces samples collected from a wild-bird garden feeding station in Scotland for the presence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2265-2267.

- Frankel, G., Candy, D. C., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A. D. & Dougan, G. (1995). Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 4323-4328.
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y. & Rosenshine, I. (1999). Hierarchy in the expression of the *locus* of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**, 941-952.
- Fuchs, S., Muhldorfer, I., Donohue-Rolfe, A., Kerenyi, M., Emody, L., Alexiev, R., Nenkov, P. & Hacker, J. (1999). Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb Pathog* **27**, 13-23.
- Galiero, G., Conedera, G., Alfano, D. & Caprioli, A. (2005). Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet Rec* **156**, 382-383.
- Galperin, M. Y., Natale, D. A., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999). A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 303-305.
- Galperin, M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**, 552-567.
- Ganster, R. W., Taylor, B. S., Shao, L. & Geller, D. A. (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8638-8643.
- Gao, J., Morrison, D. C., Parmely, T. J., Russell, S. W. & Murphy, W. J. (1997). An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **272**, 1226-1230.
- Gao, X., Wan, F., Mateo, K. & other authors (2009). Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. *PLoS Pathog* **5**, e1000708.
- Garber, L. P., Wells, S. J., Hancock, D. D., Doyle, M. P., Tuttle, J., Shere, J. A. & Zhao, T. (1995). Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* **207**, 46-49.
- Garcia-Sanchez, A., Sanchez, S., Rubio, R., Pereira, G., Alonso, J. M., Hermoso de Mendoza, J. & Rey, J. (2007). Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet Microbiol* **121**, 373-377.
- Gardner, A. M., Gessner, C. R. & Gardner, P. R. (2003). Regulation of the nitric oxide reduction operon (*norRVW*) in *Escherichia coli*. Role of NorR and sigma54 in the nitric oxide stress response. *J Biol Chem* **278**, 10081-10086.

- Garmendia, J., Phillips, A. D., Carlier, M. F. & other authors (2004).** TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**, 1167-1183.
- Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin, V. F. (2005).** Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**, 2573-2585.
- Gauthier, A., Puente, J. L. & Finlay, B. B. (2003).** Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* **71**, 3310-3319.
- Gilberthorpe, N. J. & Poole, R. K. (2008).** Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* **283**, 11146-11154.
- Gillis, S. (1996).** The thrombocytopenic purpuras. Recognition and management. *Drugs* **51**, 942-953.
- Girardeau, J. P., Dalmaso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy-Rozand, C. & Martin, C. (2005).** Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **43**, 6098-6107.
- Glossmann, H., Petrischor, G. & Bartsch, G. (1999).** Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA). *Exp Gerontol* **34**, 305-318.
- Gobert, A. P., Daulouede, S., Lepoivre, M., Boucher, J. L., Bouteille, B., Buguet, A., Cespuglio, R., Veyret, B. & Vincendeau, P. (2000).** L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* **68**, 4653-4657.
- Gobert, A. P., Cheng, Y., Akhtar, M. & other authors (2004).** Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* **173**, 2109-2117.
- Gomelsky, M. & Klug, G. (2002).** BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**, 497-500.
- Griffin, P. M. & 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.
- Griffith, O. W. & Stuehr, D. J. (1995).** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**, 707-736.
- Gu, H., Furukawa, K. & Breaker, R. R. (2012).** Engineered Allosteric Ribozymes that Sense the Bacterial Second Messenger c-di-GMP. *Anal Chem*.

- Guvener, Z. T. & Harwood, C. S. (2007).** Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol Microbiol* **66**, 1459-1473.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130.
- Habdas, B. J., Smart, J., Kaper, J. B. & Sperandio, V. (2010).** The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **192**, 3699-3712.
- Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-679.
- Hammar, M., Bian, Z. & Normark, S. (1996).** Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6562-6566.
- Hancock, D. D., Besser, T. E., Rice, D. H., Herriott, D. E. & Tarr, P. I. (1997).** A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* **118**, 193-195.
- Hansen, A. M. & Kaper, J. B. (2009).** Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**, 446-465.
- Harmon, B. G., Brown, C. A., Tkalcic, S., Mueller, P. O., Parks, A., Jain, A. V., Zhao, T. & Doyle, M. P. (1999).** Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J Food Prot* **62**, 574-579.
- Hausladen, A., Gow, A. & Stamler, J. S. (2001).** Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10108-10112.
- Hecht, G. B. & Newton, A. (1995).** Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **177**, 6223-6229.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 373-395, table of contents.
- Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263-273.
- Hersh, B. M., Farooq, F. T., Barstad, D. N., Blankenhorn, D. L. & Slonczewski, J. L. (1996).** A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 3978-3981.

- Hickman, J. W., Tifrea, D. F. & Harwood, C. S. (2005).** A chemosensory system that regulates biofilms formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14422-14427.
- Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M. U. & other authors (2005).** A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* **56**, 1234-1245.
- Hollenbeck, J. J. & Oakley, M. G. (2000).** GCN4 binds with high affinity to DNA sequences containing a single consensus half-site. *Biochemistry* **39**, 6380-6389.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A. & Bertin, P. (2001).** Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**, 20-36.
- Hommais, F., Krin, E., Coppee, J. Y., Lacroix, C., Yeramian, E., Danchin, A. & Bertin, P. (2004).** GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**, 61-72.
- Honda, N., Iyoda, S., Yamamoto, S., Terajima, J., Watanabe, H. (2009).** LrhA positively controls the *locus* of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol Microbiol* **74**, 1393-1341.
- Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., DuPont, H. L., Dawkins, A. T. & Snyder, M. J. (1970).** Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med* **283**, 686-691.
- Huang, B., Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (2003).** FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**, 7068-7076.
- Hueck, C. J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Hurley, J. H. (2003).** GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Sci STKE* **2003**, PE1.
- Hussein, H. S. (2007).** Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* **85**, E63-72.
- Hutchings, M. I., Shearer, N., Wastell, S., van Spanning, R. J. & Spiro, S. (2000).** Heterologous NNR-mediated nitric oxide signaling in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 6434-6439.
- Hutchings, M. I., Crack, J. C., Shearer, N., Thompson, B. J., Thomson, A. J. & Spiro, S. (2002).** Transcription factor FnrP from *Paracoccus denitrificans* contains an iron-sulfur cluster and is activated by anoxia: identification of essential cysteine residues. *J Bacteriol* **184**, 503-508.

- Hyduke, D. R., Jarboe, L. R., Tran, L. M., Chou, K. J. & Liao, J. C. (2007).** Integrated network analysis identifies nitric oxide response networks and dihydroxyacid dehydratase as a crucial target in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8484-8489.
- Ichinohe, N., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Kimura, S. & Ichinohe, S. (2009).** Effects of fosfomycin on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: quantification of copy numbers of Shiga toxin-encoding genes and their expression levels using real-time PCR. *J Med Microbiol* **58**, 971-973.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. & Byrns, R. E. (1993).** Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8103-8107.
- Islam, M. S., Bingle, L. E., Pallen, M. J. & Busby, S. J. (2011).** Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Mol Microbiol* **79**, 468-483.
- Iyoda, S. & Watanabe, H. (2004).** Positive effects of multiple pch genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**, 2357-2571.
- Iyoda, S. & Watanabe, H. (2005).** ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 4086-4094.
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M. & Watanabe, H. (2006).** The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 5682-5692.
- Jenkins, C., Pearce, M. C., Chart, H. & other authors (2002).** An eight-month study of a population of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Scottish cattle herd. *J Appl Microbiol* **93**, 944-953.
- Jobichen, C., Li, M., Yerushalmi, G., Tan, Y. W., Mok, Y. K., Rosenshine, I., Leung, K. Y. & Sivaraman, J. (2007).** Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog* **3**, e69.
- Johnson, K. E., Thorpe, C. M. & Sears, C. L. (2006).** The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* **43**, 1587-1595.
- Johnson, M. D., Burton, A. N., Gutiérrez, B., Painter, K. & Lund, P. A. (2011).** RcsB Is Required For Inducible Acid Resistance In *Escherichia coli* And Acts At *gadE*-Dependent And -Independent Promoters. *J Bacteriol* **193**, 3653-3656.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Romling, U. & Melefors, O. (2008).** The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* **70**, 236-257.

- Jones-Carson, J., Laughlin, J., Hamad, M. A., Stewart, A. L., Voskuil, M. I. & Vazquez-Torres, A. (2008).** Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*. *PLoS One* **3**, e1976.
- Justino, M. C., Vicente, J. B., Teixeira, M. & Saraiva, L. M. (2005).** New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J Biol Chem* **280**, 2636-2643.
- Justino, M. C., Almeida, C. C., Teixeira, M. & 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.
- Kailasan Vanaja, S., Bergholz, T. M. & Whittam, T. S. (2009).** Characterization of the *Escherichia coli* O157:H7 Sakai GadE regulon. *J Bacteriol* **191**, 1868-1877.
- Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T. & Sasakawa, C. (2000).** SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **38**, 805-816.
- Kaper, J. B. (1998).** The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. *Jpn J Med Sci Biol* **51 Suppl**, S101-107.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140.
- Karaolis, D. K., Newstead, M. W., Zeng, X., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Bhan, U., Liang, H. & Standiford, T. J. (2007).** Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect Immun* **75**, 4942-4950.
- Karatan, E. & Watnick, P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310-347.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S. & other authors (2003).** Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* **41**, 4930-4940.
- Keen, J. E., Laegreid, W. W., Chitko-McKown, C. G., Durso, L. M. & Bono, J. L. (2010).** Distribution of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5278-5281.
- Kendall, M. M., Rasko, D. A. & Sperandio, V. (2007).** Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**, 4875-4884.

- Kendall, M. M., Rasko, D. A. & Sperandio, V. (2010).** The LysR-type regulator QseA regulates both characterized and putative virulence genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **76**, 1306-1321.
- Kishii, R., Falzon, L., Yoshida, T., Kobayashi, H. & Inouye, M. (2007).** Structural and functional studies of the HAMP domain of EnvZ, an osmosensing transmembrane histidine kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**, 26401-26408.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. & Frankel, G. (1998).** A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**, 2166-2176.
- Kolodziejwski, P. J., Rashid, M. B. & Eissa, N. T. (2003).** Intracellular formation of "undisruptable" dimers of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14263-14268.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. I. & Stavric, S. (1977).** Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**, 775-779.
- Kresse, A. U., Schulze, K., Deibel, C., Ebel, F., Rohde, M., Chakraborty, T. & Guzman, C. A. (1998).** Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 4370-4379.
- Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M. & O'Toole, G. A. (2007).** BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilms formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**, 8165-8178.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A. & other authors (2006).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2839-2844.
- Kumar, M. & Chatterji, D. (2008).** Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilms formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **154**, 2942-2955.
- La Ragione, R. M. & Woodward, M. J. (2002).** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**, 27-35.
- Laaberki, M. H., Janabi, N., Oswald, E. & Repoila, F. (2006).** Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* **296**, 197-210.
- Lanois, A., Jubelin, G. & Givaudan, A. (2008).** FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Mol Microbiol* **68**, 516-533.

- Lapeyraque, A. L., Malina, M., Fremeaux-Bacchi, V. & other authors (2011).** Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med* **364**, 2561-2563.
- Large, T. M., Walk, S. T. & Whittam, T. S. (2005).** Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2493-2500.
- Lease, R. A., Smith, D., McDonough, K. & Belfort, M. (2004).** The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 6179-6185.
- Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W. E. & Wood, T. K. (2007).** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4100-4109.
- Lee, J. H. & Stein, B. D. (2009).** Antimicrobials effective for inhibition of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains O26, O111, and O157 and their effects on Shiga toxin releases. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1238-1243.
- Levine, M. M. (1987).** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**, 377-389.
- Li, H., Meininger, C. J., Hawker, J. R., Jr., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M., Jr. & Wu, G. (2001).** Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E75-82.
- Link, A. J., Phillips, D. & Church, G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**, 6228-6237.
- Luo, Y., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Creagh, A. L., Knoechel, D. G., Haynes, C. A., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2000).** Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**, 1073-1077.
- Ma, Z., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2002).** Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol* **184**, 7001-7012.
- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2003).** GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**, 1309-1320.
- Ma, Z., Masuda, N. & Foster, J. W. (2004).** Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 7378-7389.
- Majdalani, N. & Gottesman, S. (2005).** The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**, 379-405.

- Malone, J. G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A. J. & Rainey, P. B. (2007).** The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* **153**, 980-994.
- Mates, A. K., Sayed, A. K. & Foster, J. W. (2007).** Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *J Bacteriol* **189**, 2759-2768.
- May, M. J. & Ghosh, S. (1997).** Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* **8**, 63-73.
- Mayer, R., Ross, P., Weinhouse, H. & other authors (1991).** Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5472-5476.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995).** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1664-1668.
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1999).** The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**, 296-306.
- Mellies, J. L., Barron, A. M. & Carmona, A. M. (2007).** Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* **75**, 4199-4210.
- Mellies, J. L., Larabee, F. J., Zarr, M. A., Horback, K. L., Lorenzen, E. & Mavor, D. (2008).** Ler interdomain linker is essential for anti-silencing activity in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**, 3624-3638.
- Mellies, J. L., Benison, G., McNitt, W., Mavor, D., Boniface, C. & Larabee, F. J. (2011).** Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein-DNA complexes. *Microbiology* **157**, 1123-1133.
- Mendez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Membrillo-Hernandez, J. (2006).** Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J Biol Chem* **281**, 8090-8099.
- Merkel, T. J., Barros, C. & Stibitz, S. (1998).** Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180**, 1682-1690.
- Merritt, J. H., Brothers, K. M., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. (2007).** SadC reciprocally influences biofilms formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**, 8154-8164.

- Merz, A. J., So, M. & Sheetz, M. P. (2000).** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102.
- Nathan, C. & Shiloh, M. U. (2000).** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8841-8848.
- Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J. & Fang, F. C. (2006).** Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236-238.
- Nishikawa, K., Watanabe, M., Kita, E., Igai, K., Omata, K., Yaffe, M. B. & Natori, Y. (2006).** A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin. *FASEB J* **20**, 2597-2599.
- Nivet, H., Cloarec, S. & Benoit, S. (1995).** Syndrome hémolytique et urémique: rôle des Vérotoxines, épidémiologie et prévention. *Rev Med Tours* **29**, 283-284.
- O'Brien, A. D., Lively, T. A., Chang, T. W. & Gorbach, S. L. (1983).** Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* **2**, 573.
- O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W. & Formal, S. B. (1984).** Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694-696.
- O'Brien, A. D. & Holmes, R. K. (1987).** Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**, 206-220.
- Ochman, H. & Selander, R. K. (1984).** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**, 690-693.
- Ogden, I. D., MacRae, M. & Strachan, N. J. (2004).** Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol Lett* **233**, 297-300.
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. & Abe, A. (2006).** Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 2801-2811.
- Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I. D. & Strachan, N. J. (2003).** Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2444-2447.
- Opdyke, J. A., Kang, J. G. & Storz, G. (2004).** GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 6698-6705.

- Partridge, J. D., Bodenmiller, D. M., Humphrys, M. S. & 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.
- Paton, A. W., Morona, R. & Paton, J. C. (2000).** A new biological agent for treatment of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med* **6**, 265-270.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. (2004).** Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**, 715-727.
- Perry, R. D., Bobrov, A. G., Kirillina, O., Jones, H. A., Pedersen, L., Abney, J. & Fetherston, J. D. (2004).** Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J Bacteriol* **186**, 1638-1647.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. & Hengge, R. (2008).** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434-2446.
- Poock, S. R., Leach, E. R., Moir, J. W., Cole, J. A. & Richardson, D. J. (2002).** Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 23664-23669.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A. (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **282**, 12860-12870.
- Pritchard, G. C., Williamson, S., Carson, T., Bailey, J. R., Warner, L., Willshaw, G. & Cheasty, T. (2001).** Wild rabbits--a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Rec* **149**, 567.
- Pruss, B. M. (2000).** FlhD, a transcriptional regulator in bacteria. *Recent Res Dev Microbiol* **4**, 31-42.
- Pullan, S. T., Gidley, M. D., Jones, R. A., Barrett, J., Stevanin, T. M., Read, R. C., Green, J. & Poole, R. K. (2007).** 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* **189**, 1845-1855.
- Pyles, E. A., Chin, A. J. & Lee, J. C. (1998).** *Escherichia coli* cAMP receptor protein-DNA complexes. 1. Energetic contributions of half-sites and flanking sequences in DNA recognition. *Biochemistry* **37**, 5194-5200.
- Raman, C. S., Martasek, P. & Masters, B. S. (2000).** Structural themes determining functions in nitric oxide synthases. *The porphyrin handbook*, 293-339.
- Rasko, D. A., Webster, D. R., Sahl, J. W. & other authors (2011).** Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* **365**, 709-717.

- Reading, N. C., Torres, A. G., Kendall, M. M., Hughes, D. T., Yamamoto, K. & Sperandio, V. (2007).** A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol* **189**, 2468-2476.
- Reiter, T. A. (2006).** NO* chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep* **11**, 194-206.
- Ritchie, J. M., Wagner, P. L., Acheson, D. W. & Waldor, M. K. (2003).** Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1059-1066.
- Ritchie, J. M. & Waldor, M. K. (2005).** The *locus* of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity in infant rabbits. *Infect Immun* **73**, 1466-1474.
- Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J. & Gelfand, M. S. (2005).** Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput Biol* **1**, e55.
- Romling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**, 629-639.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y. & other authors (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281.
- Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V. & Gomelsky, M. (2005).** Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187**, 1792-1798.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Romling, U. & Gomelsky, M. (2006).** The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**, 30310-30314.
- Sanchez-Torres, V., Hu, H. & Wood, T. K. (2011).** GGDEF proteins YeaI, YedQ, and YfiN reduce early biofilms formation and swimming motility in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 651-658.
- Sayed, A. K. & Foster, J. W. (2009).** A 750 bp sensory integration region directs global control of the *Escherichia coli* GadE acid resistance regulator. *Mol Microbiol* **71**, 1435-1450.
- Scaife, H. R., Cowan, D., Finney, J., Kinghorn-Perry, S. F. & Crook, B. (2006).** Wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as potential carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Rec* **159**, 175-178.
- Scheutz, F., Nielsen, E. M., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J. P. & Caprioli, A. (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**.

Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187**, 4774-4781.

Scotland, S. M., Smith, H. R., Willshaw, G. A. & Rowe, B. (1983). Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* **2**, 216.

Seshasayee, A. S., Fraser, G. M. & Luscombe, N. M. (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **38**, 5970-5981.

Shakhnovich, E. A., Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2009). Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol Microbiol* **74**, 347-363.

Sharma, V. K. & Zuerner, R. L. (2004). Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **186**, 7290-7301.

Sharma, V. K., Bearson, S. M. & Bearson, B. L. (2010). Evaluation of the effects of *sdiA*, a luxR homologue, on adherence and motility of *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* **156**, 1303-1312.

Sharp, F. C. & Sperandio, V. (2007). QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**, 2432-2440.

Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K. & Karmali, M. A. (2005). Identification of four fimbria-encoding genomic islands that are highly specific for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157 strains. *J Clin Microbiol* **43**, 3840-3850.

Sheoran, A. S., Chapman-Bonofiglio, S., Harvey, B. R., Mukherjee, J., Georgiou, G., Donohue-Rolfe, A. & Tzipori, S. (2005). Human antibody against shiga toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. *Infect Immun* **73**, 4607-4613.

Shere, J. A., Bartlett, K. J. & Kaspar, C. W. (1998). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1390-1399.

Sherman, P. M. & Soni, R. (1988). Adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O157:H7 to human epithelial cells in tissue culture: role of outer membranes as bacterial adhesins. *J Med Microbiol* **26**, 11-17.

Shin, S., Castanie-Cornet, M. P., Foster, J. W., Crawford, J. A., Brinkley, C. & Kaper, J. B. (2001). An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* **41**, 1133-1150.

- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. (2004).** GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**, 1123-1134.
- Simm, R., Fetherston, J. D., Kader, A., Romling, U. & Perry, R. D. (2005).** Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *J Bacteriol* **187**, 6816-6823.
- Singh, K., Balligand, J. L., Fischer, T. A., Smith, T. W. & Kelly, R. A. (1996).** Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha. *J Biol Chem* **271**, 1111-1117.
- Smith, D. K., Kassam, T., Singh, B. & Elliott, J. F. (1992).** *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J Bacteriol* **174**, 5820-5826.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N. & Hengge, R. (2009).** Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**, 1318-1331.
- Sperandio, V., Kaper, J. B., Bortolini, M. R., Neves, B. C., Keller, R. & Trabulsi, L. R. (1998).** Characterization of the *locus* of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 133-139.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Delahay, R. M., Frankel, G., Crawford, J. A., Nguyen, W. & Kaper, J. B. (2000).** Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* **38**, 781-793.
- Sperandio, V., Li, C. C. & Kaper, J. B. (2002).** Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* **70**, 3085-3093.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Jarvis, B., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (2003).** Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8951-8956.
- Stempelj, M., Kedinger, M., Augenlicht, L. & Klampfer, L. (2007).** Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. *J Biol Chem* **282**, 9797-9804.
- Strockbine, N. A., Jackson, M. P., Sung, L. M., Holmes, R. K. & O'Brien, A. D. (1988).** Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**, 1116-1122.
- Subczynski, W. K., Lomnicka, M. & Hyde, J. S. (1996).** Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free Radic Res* **24**, 343-349.

- Suchner, U., Kuhn, K. S. & Furst, P. (2000).** The scientific basis of immunonutrition. *Proc Nutr Soc* **59**, 553-563.
- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H. & Breaker, R. R. (2008).** Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**, 411-413.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R. & Romeo, T. (2006).** Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**, 2605-2617.
- Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. & Landini, P. (2010).** The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology* **156**, 2901-2911.
- Takeda, T. (1998).** Strategy to prevent the progression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection to hemolytic uremic syndrome. *Jpn J Med Sci Biol* **51 Suppl**, S124-128.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. (2006).** An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**, 34751-34758.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H. & other authors (2001).** *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**, 6660-6669.
- Tatsuno, I., Nagano, K., Taguchi, K., Rong, L., Mori, H. & Sasakawa, C. (2003).** Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **71**, 2598-2606.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.
- Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D. & Samuel, J. E. (1993).** Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun* **61**, 3392-3402.
- Tischler, A. D. & Camilli, A. (2005).** Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun* **73**, 5873-5882.
- Tramonti, A., De Canio, M. & De Biase, D. (2008).** GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gadY-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol* **70**, 965-982.

- Tree, J. J., Wolfson, E. B., Wang, D., Roe, A. J. & Gally, D. L. (2009).** Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **17**, 361-370.
- Tree, J. J., Roe, A. J., Flockhart, A. & other authors (2011).** Transcriptional regulators of the GAD acid stress island are carried by effector protein-encoding prophages and indirectly control type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **80**, 1349-1365.
- Tschowri, N., Busse, S. & Hengge, R. (2009).** The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**, 522-534.
- Tucker, D. L., Tucker, N., Ma, Z., Foster, J. W., Miranda, R. L., Cohen, P. S. & Conway, T. (2003).** Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 3190-3201.
- Tucker, N. P., D'Autreaux, B., Studholme, D. J., Spiro, S. & 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.
- Tucker, N. P., Hicks, M. G., Clarke, T. A., Crack, J. C., Chandra, G., Le Brun, N. E., Dixon, R. & Hutchings, M. I. (2008).** The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One* **3**, e3623.
- Tucker, N. P., Ghosh, T., Bush, M., Zhang, X. & Dixon, R. (2010a).** Essential roles of three enhancer sites in sigma54-dependent transcription by the nitric oxide sensing regulatory protein NorR. *Nucleic Acids Res* **38**, 1182-1194.
- Tucker, N. P., Le Brun, N. E., Dixon, R. & Hutchings, M. I. (2010b).** There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol* **18**, 149-156.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Sousa, E. H., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M. & Gilles-Gonzalez, M. A. (2009).** An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* **48**, 9764-9774.
- Umanski, T., Rosenshine, I. & Friedberg, D. (2002).** Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 2735-2744.
- Vallance, B. A., Deng, W., De Grado, M., Chan, C., Jacobson, K. & Finlay, B. B. (2002).** Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. *Infect Immun* **70**, 6424-6435.
- Vareille, M. (2008).** La réponse immunitaire mucoale intestinale lors de l'infection par les *Escherichia coli* entérohémostatiques: Rôle et régulation de la synthèse de monoxyde d'azote. Thèse d'université, Université Blaise Pascal.
- Vareille, M., de Sablet, T., Hindre, T., Martin, C. & Gobert, A. P. (2007).** Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10199-10204.

- Vareille, M., Rannou, F., Thelier, N., Glasser, A. L., de Sablet, T., Martin, C. & Gobert, A. P. (2008). Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. *J Immunol* **180**, 5720-5726.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Bertin, Y., Trably, F., Girardeau, J. P., Martin, C., Livrelli, V. & Beutin, L. (2004). Serotyping, *stx2* subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2556-2559.
- Viswanathan, V. K. & Hecht, G. (2000). Innate immunity and the gut. *Curr Opin Gastroenterol* **16**, 546-551.
- Wadolkowski, E. A., Sung, L. M., Burris, J. A., Samuel, J. E. & O'Brien, A. D. (1990). Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* **58**, 3959-3965.
- Wales, A. D., Pearson, G. R., Skuse, A. M., Roe, J. M., Hayes, C. M., Cookson, A. L. & Woodward, M. J. (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. & Lenardo, M. J. (2011). IKKbeta phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF-kappaB function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. *Nat Immunol* **12**, 335-343.
- Wang, X., Preston, J. F., 3rd & Romeo, T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilms formation. *J Bacteriol* **186**, 2724-2734.
- Waters, C. M., Lu, W., Rabinowitz, J. D. & Bassler, B. L. (2008). Quorum sensing controls biofilms formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J Bacteriol* **190**, 2527-2536.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**, 1591-1603.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. & Hengge, R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1014-1034.
- Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D. & other authors (1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* **29**, 985-989.
- West, A. H. & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376.

- Westerholt, S., Hartung, T., Tollens, M. & other authors (2000).** Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine* **12**, 822-827.
- Wieler, L. H., McDaniel, T. K., Whittam, T. S. & Kaper, J. B. (1997).** Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 49-53.
- Wolfe, M. T., Heo, J., Garavelli, J. S. & Ludden, P. W. (2002).** Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 5898-5902.
- Wu, G. & Morris, S. M., Jr. (1998).** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336** (Pt 1), 1-17.
- Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G. & Poole, R. K. (2000).** Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide. *J Biol Chem* **275**, 4679-4686.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. & Nathan, C. (1993).** Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **177**, 1779-1784.
- Yamagami, S., Motoki, M., Kimura, T., Izumi, H., Takeda, T., Katsuura, Y. & Matsumoto, Y. (2001).** Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **184**, 738-742.
- Yamasaki, H. & Sakihama, Y. (2000).** Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**, 89-92.
- Yen, H., Ooka, T., Iguchi, A., Hayashi, T., Sugimoto, N. & Tobe, T. (2010).** NleC, a type III secretion protease, compromises NF-kappaB activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog* **6**, e1001231.
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B. & other authors (2005).** Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**, 702-707.
- Zhang, L., Chaudhuri, R. R., Constantinidou, C. & other authors (2004).** Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**, 7282-7293.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J. & Garber, L. (1995).** Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1290-1293.

Publications

Publication n°1

The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K-12 strains affects motility and biofilm formation in the enterohemorrhagic O157:H7 serotype.

Veterinary Immunology and Immunopathology.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K12 strains affects motility and biofilm formation in the enterohemorrhagic O157:H7 serotype

Priscilla Branchu^a, Thomas Hindré^{a,1}, Xin Fang^b, Robynn Thomas^b, Mark Gomelsky^b, Laurent Claret^c, Josée Harel^d, Alain P. Gobert^a, Christine Martin^{a,*}

^a INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, WY 82071, USA

^c Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, JE 2526 Evolution des bactéries pathogènes et susceptibilité génétique de l'hôte, Clermont-Ferrand, France

^d Université de Montréal, Département de Pathologie et Microbiologie, GREMP, St-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

c-di-GMP

Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

EHEC O157:H7

Biofilm

Swimming motility

Phosphodiesterase

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a foodborne pathogen that resists the acidic gastric environment, colonizes the gut epithelium, and causes hemorrhagic colitis and hemolytic–uremic syndrome, especially in children. The genomic island OI-47 of *E. coli* O157:H7 contains a gene, *z1528*, encoding an EAL-domain protein potentially involved in c-di-GMP hydrolysis that is absent in non-pathogenic *E. coli*. This gene, designated *vmpA*, is co-transcribed with *ycdT*, which is present in non pathogenic *E. coli* and encodes a diguanylate cyclase involved in c-di-GMP synthesis. To test for *vmpA* function, we constructed a *vmpA* knockout mutant. We also overexpressed *vmpA*, purified the VmpA protein and assayed for its activity *in vitro*. We found that VmpA possesses c-di-GMP phosphodiesterase activity and that the *vmpA* mutation results in increased biofilm formation, and reduced swimming motility, which is consistent with the function determined *in vitro*. Unexpectedly, suppressor mutations arise frequently in the *vmpA* background suggesting that VmpA plays an important regulatory role in *E. coli* O157:H7. These findings represent an example of remarkable flexibility in the organization of c-di-GMP signaling pathways in closely related species.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), particularly the O157:H7 serotype, is a foodborne pathogen that

causes diseases in humans ranging from mild diarrhea to life-threatening complications such as hemolytic–uremic syndrome (Paton and Paton, 1998). The main reservoir of EHEC strains is healthy ruminants (Caprioli et al., 2005). Outbreaks have been associated with exposure to the farm environment, and with the consumption of undercooked meat, raw milk and dairy products, water, and fruits or vegetables contaminated with ruminant manure (Cieslak et al., 1993; O'Brien et al., 2001; Yatsuyanagi et al., 2002).

Cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) is a cytoplasmic second messenger involved in regulation of various cellular functions including biofilm formation, motility and virulence,

* Corresponding author at: INRA Clermont-Ferrand-Theix, Unité de Microbiologie, 63122 St-Genes-Champanelle, France.

Tel.: +33 0 4 73 62 42 47; fax: +33 0 4 73 62 45 81.

E-mail address: cmartin@clermont.inra.fr (C. Martin).

¹ Present address: Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université J. Fourier Grenoble 1 - CNRS, UMR5163, Institut Jean Roget, F-38041 Grenoble, France.

in response to environmental factors (reviewed in Tamayo et al., 2007; Hengge, 2009). Intracellular concentration of c-di-GMP is controlled by the opposite activities of diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) that synthesize and degrade c-di-GMP, respectively. Protein domains associated with DGC and PDE activities have been designated GGDEF and EAL, based on the conserved amino acid motifs present in these domains. Yet another protein domain, HD-GYP, also possesses c-di-GMP PDE activity (Ryan et al., 2006). While c-di-GMP has been shown to regulate virulence in various bacterial species including *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis* and others (Tischler et al., 2002; Tischler and Camilli, 2004, 2005; Hisert et al., 2005; Kulasakara et al., 2006; Bobrov et al., 2011; He et al., 2011; Petersen et al., 2011), surprisingly few studies have explored the role of c-di-GMP in *E. coli* pathogenesis. Claret et al. (2007) showed that in the Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli*, c-di-GMP signaling pathways affect the fine tuning of flagellar and type-1 pili synthesis. Sjostrom et al. (2008) showed that in a newborn meningitis *E. coli* isolate, a putative PDE-encoding gene is present in the main S fimbrial operon. In non-pathogenic *E. coli*, c-di-GMP signaling has been shown to play a role in synthesis of curli, an important pathogenesis factor (Weber et al., 2006; Pesavento et al., 2008), however the role of c-di-GMP in curli synthesis in pathogenic *E. coli* has not been elucidated. The molecular mechanisms of c-di-GMP involvement in all of these processes remain unknown.

It has been generally accepted that reduced intracellular c-di-GMP levels are associated with increased motility, reduced biofilm formation and increased virulence in acute infections. We found that gene *z1528*, hereby designated *vmpA* gene, from the most virulent EHEC serotype O157:H7

predicted to encode an EAL domain PDE is absent in non-pathogenic *E. coli*. In this study, we explored *vmpA* function and its involvement in biology of O157:H7.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and genetic manipulations

E. coli O157:H7 strain EDL933 was used throughout the study. Mutant strains and plasmids are described in Table 1. *E. coli* strains screened for the presence of *vmpA* are listed in Table 2 and were previously described (Girardeau et al., 2005). In-frame substitution of the *vmpA* gene by a gene conferring resistance to chloramphenicol in *E. coli* EDL933 was done by using the one-step PCR-based method of Datsenko and Wanner (2000). Trans-complementation of the mutant strain was done by cloning the coding sequence of *vmpA* under the *P_{ara}* promoter in pBAD30, a low copy vector, generating p(*vmpA*). Induction of *vmpA* expression was achieved with 0.5 mM arabinose. For cis-complementation, the *vmpA* coding sequence flanked by 1.1 kb upstream to the start codon was PCR amplified using high fidelity Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Saint-Aubin, France) adding the BamHI restriction sites at the 5'- and 3'-end, and inserted in the suicide vector pKO3 (Link et al., 1997). The insert in the recombinant plasmid was entirely sequenced to check that no mutation was introduced during PCR. Then the gene encoding kanamycin resistance was cloned downstream to *vmpA* into the SmaI site of the recombinant pKO3::*vmpA* plasmid. The *vmpA*-kan DNA fragment flanked by 1 kb upstream and 1 kb downstream sequences was PCR amplified using high fidelity Pfx polymerase, treated with DpnI to eliminate the plasmid DNA, and used to replace the *vmpA*::Cam mutation of the *vmpA* mutant by the one step PCR method. Allelic

Table 1
EHEC strains, plasmids and oligonucleotides used in this study.

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference
Strains		
EDL933	Wild type EHEC O157:H7	O'Brien et al. (1983)
$\Delta vmpA$	EDL933 $\Delta vmpA$ Cam ^r	This work
$\Delta vmpA::vmpA$	$\Delta vmpA$ cis complementation Cam ^r Kan ^r	This work
Plasmids		
pBAD30	Low copy <i>P_{ara}</i> Amp ^r	Guzman et al. (1995)
pvmpA	pBAD30:: <i>vmpA</i>	This work
pKO3		Link et al. (1997)
pKO3:: <i>vmpA</i> ::Kan		This work
Oligonucleotides use	Sequence(5' → 3') ^a	
RT-PCR 1	TATTGGCGCTGTTGTGACTC	This work
RT-PCR 2	CCCAGGTGTCGTTGACTTTT	This work
RT-PCR 3	TATTGGCGCTGTTGTGACTC	This work
RT-PCR 4	CAGTAACACCCCAAGAATGC	This work
RT-PCR 5	CCGGAGAATTTCTGTGCAT	This work
RT-PCR 6	GCGTTCGGTAATCTCAAGGA	This work
<i>vmpA</i> in situ hybridization	CGACTGGCTGATAACGCACT (F) TCTCTACAGGCAGGACACCA (R)	This work
<i>vmpA</i> mRNA quantification	CGATGTTTACGGTACGAGCT (F) GGCATAAGGAACACTATGGC (R)	This work
<i>rpoA</i> mRNA quantification	GGTGAGAGTTCAGGGCAAAG (F) ACCGCGCTGAACCTTGATAC (R)	This work

^a F: forward primer; R: reverse primer.

Table 2Distribution of the *vmpA* gene among Shiga-toxin producing *E. coli* strains.

Seropathotype ^a	Serotype ^a	LEE ^a	Phylogenetic group ^a	<i>z1528</i> ^b
A	O157:H7	+	D	9/9
B	O103:H2, O111:H–, O111:H2, O26:H11, O26:H+	+	B1	0/11
C	O98:H–, O84:H–, O49:H–, O+:H–, O157: H26, O5:H–, O49:H–, OR:H25	+	B1	0/9
C	O+:H–, O+:H2, O112AC:H+, O128AB:H2, O113:H21	–	B1	0/7
C	O105:H18	–	D	0/1
D	O127:H+	+	A	0/1
D	O110, O113:H+, O113:H4	–	A	0/3
D	OR:H–, O150:H–, O76:H19	+	B1	0/3
D	O+:H21, O141:H–, O+:H8, O112AC:H19, O116:H21, O117:H7, O120:H+	–	B1	0/7
E	O113, O140:H32, O109:H–, O136:H12, O+:H27, O113:H–, O136	–	A	0/7
E	OX177:H–, Ont:H38	+	B1	0/2
E	O+:H42, O+:K84:H19, O102:H21, O103:H14, O116:H28, O117	–	B1	0/5
E	O130:H43, O132:H18, O1:H18, O1:H20	–	D	2/4

^a Strains from our collection were previously described (Girardeau et al., 2005).^b Numbers indicate the proportion of strains harboring *vmpA* as revealed by colony hybridization with a probe corresponding to the whole *vmpA* open reading frame.

exchange was selected at 42 °C on selective plates containing 50 µg/ml kanamycin. The resulting colonies were checked for chloramphenicol sensitivity. DNA recombination re-introduced the wild-type *vmpA* allele in its normal chromosomal context downstream of the *yedT* gene, followed by the kanamycin resistance gene, generating the cis-complemented mutant $\Delta vmpA::vmpA$. The construction was checked by PCR using primers in *yedT*, *vmpA* and *kan*. Growth curves in LB medium are similar for the wild-type, the *vmpA* mutant, the cis- and trans-complemented mutants, and the wild-type strain over-expressing *vmpA*.

2.2. Reverse-transcriptase PCR

Total RNA was isolated using TRIzol (Molecular Research Center, Cincinnati, USA). cDNA was amplified by PCR using the primer pairs described in Table 1. Genomic DNA and RNA were used as positive and negative control, respectively.

2.3. Colony hybridization

Colony hybridizations were performed as described by Sambrook and Russell (2001). The *vmpA* probe was obtained by PCR using PCR DIG labeling mix (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and primers described in Table 1. Hybridization and detection were performed using the DIG detection starter kit II (Roche) following the manufacturer's instructions.

2.4. Determination of intracellular c-di-GMP levels

c-di-GMP was quantified according to the method developed by Waters et al. (2008). Bacteria were grown in LB medium to an A_{600} of 0.4. After cell lysis, supernatants were collected and analyzed by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a Finnigan TSQ Quantum DiscoveryMax on a Quattro-Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, USA), coupled with an Alliance HPLC system (Waters Corporation, Milford, USA). Masslynx software from Waters was used for instrument control, data acquisition

and data processing. Purified c-di-GMP (BIOLOG, Bremen, Germany) was used to generate the standard curve. Data are given as the c-di-GMP concentration in ng per ml per unit of optical density at 600 nm and are the mean of three independent experiments. Each sample was quantified in duplicate and showed less than 10% variation between duplicates.

2.5. VmpA purification and PDE activity measurements

The *vmpA* gene was PCR-amplified from the genomic DNA of strain O157:H7 and cloned into vector pET-23a (EMD Biosciences, San Diego, CA). The plasmid was transferred into BL21(DE3) for overexpression of the VmpA-His₆ fusion. The mid-exponential phase grown cells (A_{600} 0.6) were induced with 0.4 mM IPTG for 4 h at 20 °C. The cells were collected by centrifugation. The cell pellet was resuspended in the following buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 10 mM imidazole, 5% glycerol) and passed through a French pressure mini-cell (Spectronic Instruments, Rochester, NY). The protein was loaded onto the Cobalt resin (Thermo Scientific, Rockford, IL) and purified according to the manufacturer's protocol. The purified protein was dialyzed overnight using Slide-A-Lyzer dialysis cassettes (Thermo Scientific, Rockford, IL) and tested for PDE activity.

In vitro PDE assay was performed according to a previously reported method with 0.08 µM VmpA protein in a final volume of 100 µl of reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 9.35, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 100 µM c-di-GMP) (Schmidt et al., 2005). The reaction was allowed to proceed at 37 °C for various time periods and was stopped by addition of CaCl₂ (final concentration, 10 mM). The sample was immediately boiled for 5 min and subsequently centrifuged. The supernatant was passed through a 0.22 µm filter and using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) (Schmidt et al., 2005).

2.6. Quantitative RT-PCR

cDNA templates were obtained from 1 µg of total RNA using random primers (Invitrogen) and SuperScriptII

Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Absolute copy numbers of *vmpA* mRNA were quantified by quantitative real-time PCR (qPCR) using SYBR-green on an Eppendorf Mastercycler[®] ep *realplex* (Eppendorf, Le Pecq, France) with two primers pairs matching *vmpA* and *rpoA* (Table 1) as a reference gene for normalization. Standard curves were generated for each gene by amplifying genomic DNA from EDL933 strain with gene-specific primers. Then cDNA were amplified in the same conditions as for the standards curves. Levels of gene-specific mRNA were quantified by noting the fluorescence crossing point of the samples on the corresponding standard curve, and the results are presented as the ratios between the copy number of mRNA of the genes of interest and the copy number of *rpoA* mRNA.

2.7. Biofilm and motility assays

Three μ l of bacterial overnight cultures grown in LB medium at 37 °C without shaking were inoculated directly into LB agar (0.3% agar), incubated for 8 h at 37 °C and the diameter of the diffuse growth zone was measured. Static biofilms assays were performed as described by Mendez-Ortiz et al. (2006), except that the wells contained DMEM low glucose medium (1 g l⁻¹ glucose) and were incubated at 30 °C for 24 h. After crystal violet staining, the wells were washed three times with distilled water, crystal violet was solubilized from biofilms by adding 200 μ l of 50% ethanol and the absorbance read at 595 nm on a microplate reader (μ Quant, Bio-tek Instruments, Colmar, France, Inc.). Readings from 7 to 10 wells per strain were used to calculate the average and standard error. Seven wells were not inoculated to use as negative controls.

2.8. Statistical analysis

Student's *t* test was used to determine significant differences between two treatment groups. A *P* value \leq 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. The EDL933 genome encodes an EAL domain protein, unique to the most virulent EHEC strains

The COG database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) was used to search for genes encoding proteins with EAL and GGDEF domains in the genome of the *E. coli* O157:H7 strain EDL933 (Table 3). A total of 28 genes were identified, 9 encoding proteins with an EAL domain, 12 encoding proteins with a GGDEF domain, and 7 whose products harbor both EAL and GGDEF domains. As compared with the non-pathogenic *E. coli* MG1655 genome, two genes encoding EAL proteins, *ycgF* and *ycgG*, are absent from the *E. coli* EDL933 genome. *ycgF* encodes an enzymatically inactive EAL domain protein that functions as a blue-light dependent anti-transcription factor (Tschowri et al., 2009). *ycgG* also encodes an EAL domain protein that likely is enzymatically active but the gene is not expressed in LB medium (Sommerfeldt et al., 2009). One EAL domain encoding gene, *z1528*, hereby designated *vmpA*, was present in the genome

Table 3

E. coli MG1655 and EDL933 genes that encode proteins with GGDEF and/or EAL domains.

Gene	Orthologues ^a		Identity ^b (%)	Domain ^c	
	MG1655	EDL933		GGDEF	EAL
<i>dos</i>	<i>b1489</i>	<i>z2220</i>	99	x	x
<i>rtn</i>	<i>b2176</i>	<i>z3435</i>	99.4		x
<i>yahA</i>	<i>b0315</i>	<i>z0403</i>	93.1		x
<i>yaiC</i>	<i>b0385</i>	<i>z0481</i>	99.7	x	
<i>ycdT</i>	<i>b1025</i>	<i>z1527</i>	98.7	x	
<i>ycgF</i>	<i>b1163</i>	–	N.A.		x
<i>ycgG</i>	<i>b1168</i>	–	N.A.		x
<i>yciR</i>	<i>b1285</i>	<i>z2516</i>	98.9	x	x
<i>ydaM</i>	<i>b1341</i>	<i>z2421</i>	99.3	x	
<i>yddV</i>	<i>b1490</i>	<i>z2219</i>	100	x	
<i>ydeH</i>	<i>b1535</i>	<i>z2163</i>	98.6	x	
<i>ydiV</i>	<i>b1707</i>	<i>z2736</i>	99.2		x
<i>yeal</i>	<i>b1785</i>	<i>z2825</i>	100	x	
<i>yeaj</i>	<i>b1786</i>	<i>z2826</i>	99.6 ^d	x	
<i>yeaP</i>	<i>b1794</i>	<i>z2836</i>	98.9	x	
<i>yedQ</i>	<i>b1956</i>	<i>z3047</i>	99.1	x	
<i>yegE</i>	<i>b2067</i>	<i>z3235</i>	99	x	x
<i>yfeA</i>	<i>b2395</i>	<i>z3660</i>	99.6	x	x
<i>yfgF</i>	<i>b2503</i>	<i>z3766</i>	99.3	x	x
<i>yfiN</i>	<i>b2604</i>	<i>z3898</i>	99	x	
<i>yhdA</i>	<i>b3252</i>	<i>z4611</i>	99.5	x	x
<i>yjhH</i>	<i>b3525</i>	<i>z4939</i>	99.6		x
<i>yhjK</i>	<i>b3529</i>	<i>z4943</i>	99.1	x	x
<i>yjcC</i>	<i>b4061</i>	<i>z5660</i>	98.1		x*
<i>ylaB</i>	<i>b0457</i>	<i>z0569</i>	98.8		x*
<i>yliE</i>	<i>b0833</i>	<i>z1057</i>	99.4		x
<i>yliF</i>	<i>b0834</i>	<i>z1058</i>	99.8	x	
<i>yneF</i>	<i>b1522</i>	<i>z2182</i>	99.7	x	
<i>yoaD</i>	<i>b1815</i>	<i>z2858</i>	98.9		x
<i>z1528</i>	–	<i>z1528</i>	N.A.		x

^a Pairs of orthologues are defined as genes which are “mutual best hits” in a reciprocal BLASTP search of both genomes, which encode proteins with an amino acid identity of at least 80%, and for which the aligned portion covers at least 90% of the shorter sequence (<http://colibase.bham.ac.uk/>).

^b N.A.: not applicable.

^c GGDEF domain refers to COG2199. EAL domain refers to COG2200 which is marked as x in the table and to COG4943 which is marked x* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

^d *z2826* encodes a truncated protein which lacks the first 180 amino acids of the *b1786* encoded protein.

of EDL933 but not in the genome of MG1655 (Shen et al., 2005).

vmpA encodes a protein of 536 amino acids. This protein contains the residues identified by Barends et al. (2009) to be involved in c-di-GMP binding and coordination of Mg²⁺ ions required for catalysis. Clustal W alignment of VmpA with the enzymatically active EAL domains (Schmidt et al., 2005) from PDEs PdeA1 from *Gluconacetobacter xylinus* (Tal et al., 1998) and VieA from *Vibrio cholerae* (Tamayo et al., 2005) revealed that the *vmpA*-encoded protein possesses 21 out of the 23 conserved residues found in all enzymatically active EAL domains (Schmidt et al., 2005) (Fig. 1). While no other putative domain could be identified in the VmpA protein, analysis of its sequence using the Phobius web server (Kall et al., 2007) identified three putative transmembrane helices in the N-terminal part (residue 12–28; 40–60; 253–279), suggesting that VmpA is membrane-associated. A search for identical proteins (>95% identity) using BLASTP revealed identical proteins (>95% identity) in various EHEC *E. coli* O157:H7 and EPEC

3.2. *vmpA* belongs to the fimbria-encoding genomic island OI-47

In the EDL933 genome, *vmpA* is the first gene of the fimbria-encoding genomic island OI-47 (Shen et al., 2005). OI-47 is located at bp 1420969–1452695 in the EDL933 genome and has a size of 31,727 bp. It contains 28 ORFs, including *grvA* involved in regulation of LEE gene expression (Perna et al., 2001; Tobe et al., 2005), flanked by *E. coli* K-12 genes *ycdT* upstream and *ymdE* downstream (Fig. 2A).

To determine whether *ycdT* and *vmpA*, which are separated by only 98 bp, are co-transcribed, we sought to detect a transcript encompassing both genes using reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Fig. 2B shows that the cDNA can be amplified using a forward *ycdT* and a reverse *vmpA* primers (primers 3 and 4, respectively). This transcript is indicative of the polycistronic *ycdT-vmpA* mRNA, which suggests that *ycdT* and *vmpA* are organized in an operon.

3.3. *VmpA* possesses c-di-GMP PDE activity

Overexpression of *ycdT* encoding a protein with a GGDEF domain increases intracellular c-di-GMP levels, which indicates that this protein possesses diguanylate cyclase activity (Jonas et al., 2008). Fig. 3A shows that *vmpA* was overexpressed from p(*vmpA*) by ~7-fold compared to the wild-type levels. *vmpA* overexpression resulted in

lower intracellular c-di-GMP levels compared to the wild type (Fig. 3B). This indicated that *VmpA* probably possess PDE activity. *In vitro* experiments confirmed that the EAL domain of *VmpA* possess a c-di-GMP-dependent PDE activity (Fig. 3C).

3.4. *vmpA* disruption affects biofilm formation and motility

Because c-di-GMP is known to modulate swimming motility and biofilm formation in various bacterial species (Romling and Amikam, 2006), the impact of *vmpA* inactivation on these two phenotypes was further examined. We first verified that *vmpA* inactivation was not polar by measuring the level of mRNA of *z1530*, the gene downstream of *vmpA* (data not shown). *vmpA* mRNAs were not detected in the *vmpA* mutant (Fig. 3A). We observed no growth defects in the *vmpA* mutant compared to the wild type (data not shown).

As shown in Fig. 4, inactivation of *vmpA* resulted in a significant decrease in the swimming zone in the semi-solid agar and a significant increase in biofilm formation in DMEM medium.

In order to confirm that alteration of these phenotypes was due to inactivation of *vmpA*, we complemented the mutant *in trans* with p(*vmpA*). Fig. 3A shows that *vmpA* was expressed from p(*vmpA*) as a function of

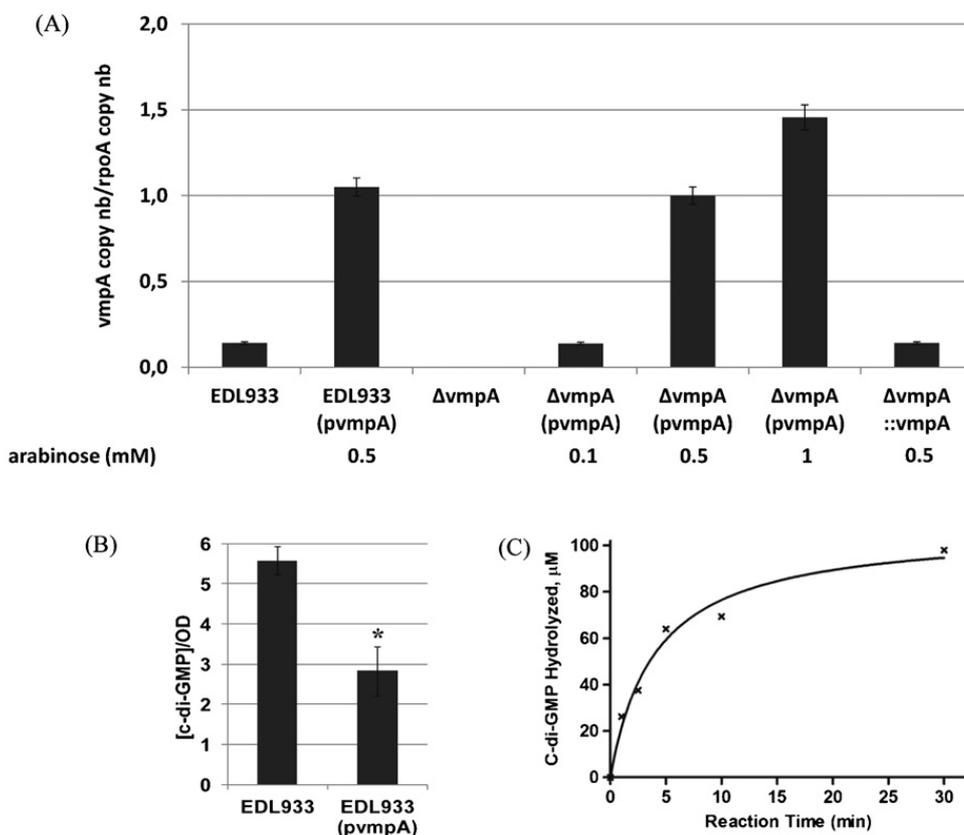


Fig. 3. *VmpA* possesses c-di-GMP PDE activity. (A) Absolute number of *vmpA* cDNA copies in the wild-type strain, the *vmpA* mutant, and the trans- and cis-complemented mutant. The housekeeping gene *rpoA* was used for normalization. *Values significantly different from EDL933 with the Student's *t* test. (B) Intracellular c-di-GMP concentration. c-di-GMP values are given per unit of optical density to normalize data relative to the bacterial concentration. In order to achieve *vmpA* overexpression, the culture medium was supplemented with 0.5 mM arabinose. *Value significantly different from EDL933 with the Student's *t* test. (C) *In vitro* activity of the EAL::His₆ domain of *VmpA*. A decrease over time in c-di-GMP concentration (from 100 µM) is plotted.

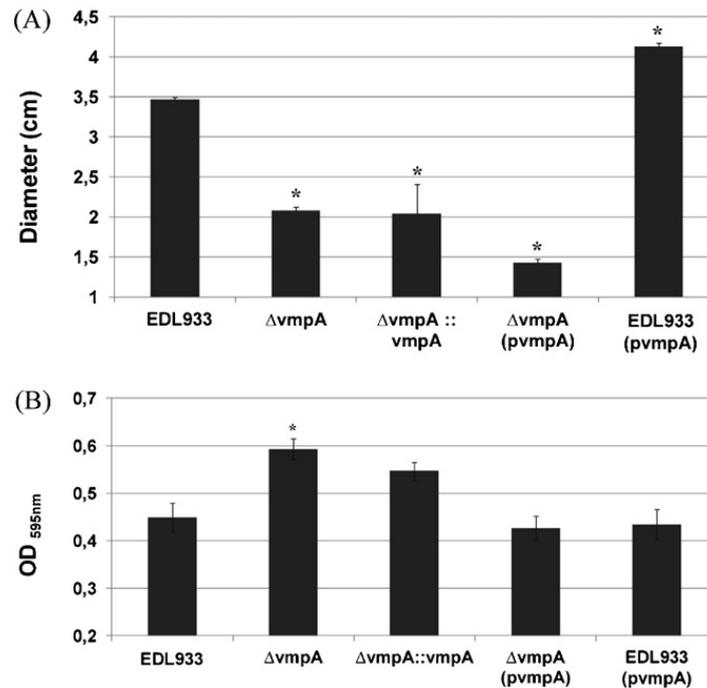


Fig. 4. Phenotypic effects of *vmpA* inactivation. (A) Swimming motility in LB after 8 h at 37 °C ($n=4$). The diameter of the diffuse growth zone is indicated. *Values significantly different from EDL933 with the Student's *t* test. (B) Biofilm formation in DMEM after 24 h at 30 °C ($n=10$). *Values significantly different from EDL933 with the Student's *t* test. $\Delta vmpA::vmpA$ is the cis-complemented *vmpA* mutant; $\Delta vmpA$ (pvmpA) is the trans-complemented *vmpA* mutant strain.

arabinose concentration. Unexpectedly, we found that *vmpA* in trans did not rescue the motility defect of the *vmpA* mutant (Fig. 4A). Because *vmpA* overexpression significantly increased motility of the wild-type strain, we knew that *vmpA* in plasmid p(vmpA) is functional (Fig. 4A). We then re-introduced the wild-type *vmpA* gene in the chromosome of the *vmpA* mutant, generating the $\Delta vmpA::vmpA$ strain. In this strain, *vmpA* is in its natural location in the chromosome and is expressed under its native promoter at similar levels as in the wild-type strain (Fig. 3A). Fig. 4A shows that swimming defect was not restored in this strain either. Taken together, these data indicate that VmpA influences motility but suggest that additional spontaneous mutations affecting motility occurred in the *vmpA* mutant.

In contrast to the inability to rescue the motility defect of the *vmpA* mutant, biofilm formation was restored or partly restored using either in trans- or in cis-complementation (Fig. 4B). These results support the conclusion that mutation of the *vmpA* gene is responsible for the observed hyperbiofilm phenotype of the *vmpA* mutant. Overexpression of *vmpA* in the wild-type strain did not decrease biofilm formation any further (Fig. 4B). *E. coli* O157:H7 strain EDL933 is a poor biofilm producer, and apparently further decrease in biofilm-forming capacity cannot be reliably detected.

Taken together, these observations demonstrated that VmpA is a component of the c-di-GMP signaling pathway influencing motility and controlling biofilm formation in *E. coli* O157:H7.

4. Discussion

Despite our growing knowledge about c-di-GMP signaling in diverse bacterial species, little is known about the role of c-di-GMP in pathogenic *E. coli*, especially in *E. coli* O157:H7.

In this study we identified VmpA (encoded by *z1528*), a new EAL domain-containing protein that is unique to the most virulent EHEC strains, belonging to the O157:H7 serotype. By investigating the distribution of the OI-47 island among STEC strains, Shen et al. (2005) also found that *z1528* is associated with the most virulent EHEC strains, with all the O157 strains tested and only 5 among 56 non-O157 strains being positive for *z1528* (O132:NM, O113:NM, 3 strains O145:NM).

We used *in vitro* and *in vivo* tests to show that VmpA possesses PDE activity and that it inversely regulates swimming motility and biofilm formation. Noticeably, VmpA is encoded by the genomic O-Island OI-47 that is absent from the MG1655 *E. coli* K12 genome. *vmpA* is located next to the *ycdT* gene, which is present in both K12 and O157:H7 *E. coli* strains. We established that *ycdT* and *vmpA* are organized in an operon in *E. coli* O157:H7 strongly suggesting that the OI-47 island was present in the ancestor of *E. coli* K12 and O157:H7 strains, and has been deleted from the K12 strains. This genetic organization in O157:H7 strains also suggests that YcdT and VmpA regulate the same physiological processes by c-di-GMP signaling. Indeed, it was observed that genes encoding PDE and DGC partners in a c-di-GMP control module are often clustered (Hengge,

2009). Furthermore, YcdT and VmpA are both predicted to be membrane bound, arguing for a co-ordinated regulation of local c-di-GMP concentration. YcdT is a GGDEF domain-containing protein that has been shown to regulate motility in *E. coli* K12 (Jonas et al., 2008). In addition, YcdT was suspected to have an impact on biofilm formation in *E. coli* K12 because the *ycdT* gene and the *pga* operon, encoding the biofilm polysaccharide poly β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA), are adjacent and divergently organized (Wang et al., 2005; Jonas et al., 2008), and a comprehensive bioinformatic study revealed that chromosomal proximity indicates gene co-regulation independent of gene orientation (Korbel et al., 2004). However, neither *pgaA* expression nor biofilm formation are altered in an *ycdT* mutant (Wang et al., 2005; Jonas et al., 2008). We demonstrate in this study that VmpA does control *E. coli* O157:H7 motility in an inverse manner to YcdT in *E. coli* K12. Furthermore, we establish that VmpA, which is absent in *E. coli* K12, also controls biofilm formation. These data suggest that VmpA but not YcdT activity is essential to the control of biofilm formation in *E. coli*.

The motility defect of the *vmpA* mutant was not restored by cis or trans-complementation with the wild-type *vmpA* gene. In addition to the detailed *vmpA* mutant described above, we constructed several other *vmpA* mutants, some of which contained small or less large in-frame deletions of *vmpA*, while others contained a transposon insertion (data not shown). We tried to complement these different mutants by the *vmpA* gene flanked by the *ycdT-vmpA* intergenic region, or by cloning the whole *ycdT-vmpA* operon. In neither case the motility defect of the *vmpA* mutant was restored (data not shown). These data strongly suggest that the *vmpA* mutant accumulates spontaneous secondary mutations with high frequency. Suppressor mutations have been shown to emerge in strains with deletion of a pleiotropic regulatory gene that directly or indirectly controls the expression of a large number of genes involved in bacterial physiology and bacterial virulence, such as *hfq* (Shakhnovich et al., 2009) or *rpoE* (Button et al., 2007; Hayden and Ades, 2008). The emergence of secondary mutations in the diverse *vmpA* mutants suggests one of two possibilities: (i) VmpA is a global regulator of *E. coli* O157:H7 physiology and its deletion without suppressor mutations severely compromises bacterial growth, (ii) alternatively, it is possible that in the absence of VmpA, local or global c-di-GMP concentration in O157:H7 rises to the toxic levels, which are intolerable in the absence of the secondary mutations. That elevated levels of c-di-GMP are toxic to some *E. coli* strains has been demonstrated by us earlier (Ryjenkov et al., 2005).

Future studies will explore the nature of the suppressor mutations, VmpA targets and the nature of input signals controlling its expression and/or activity. These studies are expected to lead to a better understanding of the regulatory role of VmpA and its potential connection to virulence of the EHEC strains. However, already at this stage our findings represent an example of remarkable flexibility in the organization of c-di-GMP signaling pathways in closely related species, where a gene absent in the laboratory strains of *E. coli* K12 plays important roles in the physiology of pathovar O157:H7.

Conflict of interest statement

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

Acknowledgements

We thank A. Garrivier, A. Durand and J. Pouzadoux for excellent technical assistance, and B. Lyan, from the Metabolism Exploration Platform (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for intracellular c-di-GMP quantification. This work was supported in part by EADGENE N° FOOD-CT-2004-506416, network of excellence supported by funding under the 6th research framework program of the European Union (C.M.), US National Science Foundation grant MCB 1052575 (M.G.), US Department of Agriculture AFRI 2010-65201-20599 (M.G.) University of Wyoming Agricultural Experiment Station (M.G.), and Natural Sciences and Engineering Research Council STPGP 364950 (J.H.).

References

- Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoeman, R.L., Gomelsky, M., Schlichting, I., 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* 459, 1015–1018.
- Bobrov, A.G., Kirillina, O., Ryjenkov, D.A., Waters, C.M., Price, P.A., Fetherston, J.D., Mack, D., Goldman, W.E., Gomelsky, M., Perry, R.D., 2011. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 79, 533–551.
- Button, J.E., Silhavy, T.J., Ruiz, N., 2007. A suppressor of cell death caused by the loss of sigmaE downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 1523–1530.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289–311.
- Cieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J., Smith, M.G., 1993. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 342, 367.
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., Darfeuille-Michaud, A., 2007. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33275–33283.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645.
- Girardeau, J.P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozzy-Rozand, C., Martin, C., 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6098–6107.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130.
- Hayden, J.D., Ades, S.E., 2008. The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 3, e1573.
- He, M., Ouyang, Z., Troxell, B., Xu, H., Moh, A., Piesman, J., Norgard, M.V., Gomelsky, M., Yang, X.F., 2011. Cyclic di-GMP is essential for the survival of the Lyme disease spirochete in ticks. *PLoS Pathog.* 7, e1002133.
- Hengge, R., 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263–273.
- Hisert, K.B., MacCoss, M., Shiloh, M.U., Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrt, S., Zhang, Z., Gaffney, B.L., Gandotra, S., Holden, D.W., Murray, D., Nathan, C., 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol. Microbiol.* 56, 1234–1245.

- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Romling, U., Meleforts, O., 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* 70, 236–257.
- Kall, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L., 2007. Advantages of combined trans-membrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35, W429–W432.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930–4940.
- Korbil, J.O., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2004. Analysis of genomic context: prediction of functional associations from conserved bidirectionally transcribed gene pairs. *Nat. Biotechnol.* 22, 911–917.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neely, A.N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F.M., Lory, S., 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2839–2844.
- Link, A.J., Phillips, D., Church, G.M., 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179, 6228–6237.
- Mendez-Ortiz, M.M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Membrillo-Hernandez, J., 2006. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J. Biol. Chem.* 281, 8090–8099.
- O'Brien, A.O., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B., 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1, 702.
- O'Brien, S.J., Adak, G.K., Gilham, C., 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 1049–1051.
- Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.
- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Limk, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J.Y., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529–533.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A., Hengge, R., 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 22, 2434–2446.
- Petersen, E., Chaudhuri, P., Gourley, C., Harms, J., Splitter, G., 2011. *Brucella melitensis* cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes. *J. Bacteriol.* 193, 5683–5691.
- Romling, U., Amikam, D., 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 218–228.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Dow, J.M., 2006. Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J. Bacteriol.* 188, 8327–8334.
- Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O.V., Gomelsky, M., 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* 187, 1792–1798.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* 187, 4774–4781.
- Shakhnovich, E.A., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2009. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol. Microbiol.* 74, 347–363.
- Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K., Karmali, M.A., 2005. Identification of four fimbria-encoding genomic islands that are highly specific for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3840–3850.
- Sjostrom, A.E., Sonden, B., Muller, C., Rydstrom, A., Dobrindt, U., Wai, S.N., Uhlin, B.E., 2008. Analysis of the *sfaX(II)* locus in the *Escherichia coli* meningitis isolate IHE3034 reveals two novel regulatory genes within the promoter-distal region of the main S fimbrial operon. *Microb. Pathog.* 46, 150–158.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., Hengge, R., 2009. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* 155, 1318–1331.
- Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., Benziman, M., 1998. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* 180, 4416–4425.
- Tamayo, R., Pratt, J.T., Camilli, A., 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 131–148.
- Tamayo, R., Tischler, A.D., Camilli, A., 2005. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 280, 33324–33330.
- Tischler, A.D., Camilli, A., 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 53, 857–869.
- Tischler, A.D., Camilli, A., 2005. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 73, 5873–5882.
- Tischler, A.D., Lee, S.H., Camilli, A., 2002. The *Vibrio cholerae* vieSAB locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J. Bacteriol.* 184, 4104–4113.
- Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara, S., Sugimoto, N., 2005. Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 58, 320–333.
- Tschowri, N., Busse, S., Hengge, R., 2009. The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 23, 522–534.
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P., Romeo, T., 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 56, 1648–1663.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., Bassler, B.L., 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* 190, 2527–2536.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., Hengge, R., 2006. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 62, 1014–1034.
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K., 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 40, 294–297.

Publication n°2

NsrR, GadE and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide.

En revision dans PLOS Pathogens

1 **NsrR, GadE and GadX INTERPLAY in REPRESSING EXPRESSION of the**
2 ***ESCHERICHIA COLI* O157:H7 LEE PATHOGENICITY ISLAND in RESPONSE to**
3 **NITRIC OXIDE**

4

5 Priscilla Branchu¹, Marjolaine Vareille^{1,†}, Sébastien Crépin^{2,‡}, Josée Harel², Alexandra
6 Durand¹, Alain P. Gobert¹, Christine Martin^{1*}

7

8 ¹U454 Microbiologie, CR Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

9 ²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de
10 Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec,
11 Canada

12 [†]Present address: UMR 1019 UDA/INRA, Unité de Nutrition Humaine, Facultés de Médecine
13 et Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand

14 [‡]Present address: Department of Microbiology & Immunology, University of Michigan
15 Medical School, 6733 Medical Science Building II, 1150 West Medical Center Drive, Ann
16 Arbor, MI 48109-5620

17

18

19 * Corresponding author: e.mail: christine.martin@clermont.inra.fr.

20 Fax number: +33 473624581

21 Tel number: +33 473624743

22

23 Running title: Nitric oxide-dependent inhibition of the LEE

24

25 Keywords: Enterohemorrhagic *E. coli*, *E. coli* O157:H7, locus of enterocyte effacement, nitric
26 oxide, NsrR

27

1 **Abstract**

2 Expression of genes of the locus of enterocyte effacement (LEE) is essential for adherence of
3 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) to intestinal epithelial cells. However, gut factors
4 that may modulate EHEC adherence are largely unknown. Because nitric oxide (NO) is a
5 crucial effector of the intestinal immune response to a bacterial infection, we investigated its
6 influence on LEE expression. We demonstrated that NO inhibits EHEC adherence to
7 epithelial cells and expression of several LEE genes. By analysing LEE gene expression using
8 quantitative real-time PCR in diverse isogenic regulatory mutants, we identified the
9 regulatory NO-sensor protein NsrR as the main regulator controlling NO-dependent
10 repression of the LEE genes. We found that NsrR is a positive regulator of the LEE1, LEE4
11 and LEE5 promoters, and chromatin immunoprecipitation showed that NO relieves the *in vivo*
12 NsrR binding to these DNA targets, leading to repression of LEE gene expression. Moreover,
13 we found that two regulators of the acid resistance pathway, GadE and GadX, interplay in
14 repressing LEE expression. Under NO exposure *gadE* and *gadX* are up-regulated,
15 contributing to down-regulation of the LEE genes. According to our results we propose a
16 model of transcriptional regulation of the LEE1, LEE4, and LEE5 genes presenting the
17 interplay of NsrR, GadE, and GadX in repressing LEE gene expression in response to NO.
18 We have previously shown that NO inhibits Shiga toxin synthesis. Since NO inhibits the two
19 major virulence factors of EHEC, Shiga toxin production and adhesion, it could be considered
20 as a potential protective factor limiting the development of haemolytic and uremic syndrome.

21

22 **Author Summary**

23 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a food-borne pathogen causing in humans
24 bloody diarrhea and, especially in children under five, life threatening kidney damage leading
25 to death in 5% of cases. Antibiotics are contra-indicated because they are suspected to
26 increase the severity of the disease. Therefore it is crucial to develop alternative preventive or
27 therapeutic strategies to fight against EHEC infection. To reach this goal, a deeper basic
28 knowledge of pathogen-host interaction is required. A critical step in EHEC infection is the
29 adhesion of bacterial cells to intestinal epithelial cells. In response to the bacterial infection,
30 the host triggers an immune response directed against the pathogen. The current study has
31 shown that a main effector of this immune response, nitric oxide (NO), dramatically reduces
32 the capacity of EHEC to adhere to intestinal epithelial cells. We have investigated the
33 molecular mechanisms involved and identified a NO-sensor regulator that controls the genes
34 required for EHEC adhesion. This finding points NO as a potential protective factor limiting

- 1 the development of EHEC disease and provides a new avenue of investigation for preventive
- 2 or therapeutic strategies against EHEC infection.
- 3

1 **Introduction**

2 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), especially belonging to the O157:H7
3 serotype, is a food-borne pathogen causing a spectrum of human illnesses such as
4 haemorrhagic colitis and haemolytic-uremic syndrome (HUS). The main virulence factors of
5 EHEC are Shiga toxins (Stx), responsible for the hemorrhagic symptoms of the infection, and
6 a type III protein secretion system (T3SS), through which the pathogen translocates effector
7 proteins into host cells, causing attaching and effacing (A/E) lesions [1]. The genes required
8 for A/E lesions are encoded within a chromosomal pathogenicity island named the locus of
9 enterocyte effacement (LEE) [2]. The LEE is composed of five major operons. The first gene
10 of the LEE1 operon, *ler*, encodes a transcriptional regulator that positively regulates the
11 expression of the LEE2, LEE3, LEE4 and LEE5 operons [3-6]. The LEE encodes the T3SS,
12 an adhesin (the intimin Eae) and its receptor (Tir) required for intimate adherence to epithelial
13 cells, and effector proteins translocated through the T3SS, including EspA that constitutes the
14 translocon through which effector proteins are injected into the host cell. The regulation of
15 LEE expression is complex and involves many positive and negative regulators [7]. Most of
16 these factors influence LEE expression by directly or indirectly controlling *ler* expression.
17 However a variety of extra-transcriptional mechanisms have also been described that regulate
18 LEE expression, though little detailed mechanistic information is available [8]. GadE
19 (formerly YhiE) and GadX are two main regulators of the acid fitness island involved in acid-
20 resistance (AR) in *E. coli* K12 [9-11]. At acidic pH values, GadE and GadX positively
21 regulate the *gadA* and *gadBC* genes, encoding the components of the glutamate-dependent
22 AR. In the EHEC O157:H7 Sakai strain, GadE has acquired additional functions and
23 inversely coordinates expression of AR and LEE genes. It has been proposed that, during
24 passage through the human stomach, GadE protects *E. coli* O157:H7 by inducing the
25 glutamate-dependent AR system (the GAD system) and inhibits the unnecessary expression
26 of the LEE genes, while environmental cues in the intestine lead to downregulation of *gadE*
27 and upregulation of the LEE genes [12]. In *E. coli* O157:H7, GadE has been shown to directly
28 bind the *ler* (LEE1) and *sepZ* (LEE2) promoters *in vitro* [13], but binding of GadE to other
29 locations and binding of GadX have never been investigated.

30 Adhesion of EHEC to epithelial intestinal cells results in A/E lesions and induction of
31 a strong innate immune response. Clinical studies have highlighted the high level of
32 circulating chemokines and type 1 cytokines in HUS patients [14-16]. Nitric oxide (NO) is an
33 effector of the mucosal immune response that is cytotoxic for pathogenic bacteria [17] or may
34 induce changes in gene expression [18-20]. Cellular production of NO requires the enzyme

1 NO synthase that oxidizes L-arginine as a substrate. The inducible NO synthase (iNOS)
2 isoform is expressed in numerous cells, including enterocytes, in response to type 1 cytokines
3 [21].

4 We have previously shown that NO inhibits Shiga toxin 2 synthesis (Stx2) by EHEC
5 O157:H7 at the transcriptional level [22]. Our aim was to investigate whether NO also
6 modulates LEE gene transcription and therefore EHEC adhesion to epithelial cells, and to
7 identify the main regulators mediating this response. We establish that NO represses LEE
8 expression through NsrR, the key regulator of the nitrosative stress in enterobacteria. NsrR
9 directly activates LEE1, LEE5, and LEE4 expression in the absence of NO, and this
10 activation is abrogated in the absence of NO. Moreover, NsrR indirectly represses *gadE*
11 expression, so that under NO exposure *gadE* is up-regulated, contributing to down-regulation
12 of the LEE genes. In addition, we identified GadX as a repressor of LEE1 expression and we
13 propose a model of transcriptional regulation of the LEE1, LEE4, and LEE5 genes presenting
14 the interplay of NsrR, GadE, and GadX in repressing LEE gene expression in response to NO.
15 Finally, we show that these regulators and NO play a critical role in controlling EHEC
16 adhesion to epithelial cells.

17 18 **Results**

19 20 **Influence of NO on adhesion of EDL933 to intestinal epithelial cells**

21 To investigate the influence of NO on EHEC adhesion, we examined adhesion of the
22 *E. coli* O157:H7 strain EDL933 to cultured Hct-8 intestinal epithelial cells in the presence of
23 exogenous NO, released by the NO donor NOR-4. Exposure to NOR-4 at 200 μ M or 500 μ M
24 did not cause any significant difference in the growth rate of EDL933 (data not shown).
25 Inhibition of cell adhesion was observed under NO exposure, which was NOR-4 dose-
26 dependent (Fig. 1). In another set of experiments, we stimulated the cultured cells with a
27 cocktail of cytokines known to induce iNOS expression in human intestinal epithelial cells
28 [21,23]. Figure 1 shows that endogenous NO produced directly by the epithelial cells also
29 inhibited bacterial adhesion.

30 31 **Gene expression under NO exposure**

32 To investigate whether the NO-dependent inhibition of adhesion to epithelial cells
33 results from inhibition of LEE expression, EDL933 was exposed to NO for 6 h using NOR-4
34 as a source of NO. Absolute numbers of specific mRNA molecules were assessed by qRT-

1 PCR and normalized using the house keeping gene *rpoA* as described in the materials and
2 methods section. Figure 2 shows that *ler* (LEE1), *espA* (LEE4), *tir* and *eae* (LEE5) were
3 down-regulated by NO, while *sepZ* (LEE2) was up-regulated and expression of *escV* (LEE3)
4 was unchanged. In addition, microarray hybridization showed that *gadE* expression was up-
5 regulated under NO exposure (our unpublished data). As GadE has been shown to repress
6 LEE expression [12,24], we further investigated *gadE* expression under NO exposure using
7 qRT-PCR. Because GadE and GadX interplay in the same regulatory circuits in *E. coli* K12,
8 and because GadX has been shown to repress *ler* expression in enteropathogenic *E. coli* [25],
9 we also investigated the influence of NO on *gadX* expression. Figure 2 shows that *gadE* and
10 *gadX* were up-regulated 2.4- and 2.7-fold, respectively, under NO exposure. These data
11 prompted us to wonder whether NO-dependent down-regulation of LEE1, LEE4 and LEE5
12 required GadE and/or GadX.

13

14 **Role of GadE and GadX on LEE expression**

15 Since the role of GadX and GadE on LEE expression is not well defined and is
16 strongly dependent on the growth conditions [12,24,25], we first analysed the expression of
17 *ler* (LEE1), *espA* (LEE4), and *tir* (LEE5) in EDL933 Δ *gadE* and Δ *gadX* mutants in our
18 culture conditions (DMEM-HEPES, 0.1% glucose, pH 7.0, stationary phase of growth)
19 without NO exposure. Using qRT-PCR analysis, we found that *ler* mRNA levels increased in
20 the Δ *gadE* (1.4-fold) and Δ *gadX* (4.5-fold) mutants (Fig. 3A), indicating that GadE and GadX
21 repress *ler* transcription. GadE and GadX also modulated the expression level of *espA* and *tir*
22 but in an opposite way. Indeed, GadE repressed *espA* (2.3-fold) and *tir* (2-fold) transcription,
23 whereas GadX activated the expression of both genes, 2.6-fold for *espA* and 17.3-fold for *tir*
24 (Fig. 3B,C). To ensure that the changes in mRNA levels resulted from disruption of either the
25 *gadE* or *gadX* gene, we cloned *gadE* or *gadX* in a low copy number plasmid vector under the
26 control of the *araC* promoter, and introduced the resulting plasmids into their corresponding
27 mutants. The levels of *espA* mRNA decreased and of *tir* mRNA tended to decrease ($P = 0.08$)
28 under *gadE* over-expression compared to the wild-type strain, while levels of *ler* mRNA were
29 similar in both strains (Fig. 3A,B,C). These data strongly suggest that GadE may repress
30 LEE4 and LEE5 transcription independently of Ler. *gadX* over-expression restored *tir*
31 expression, whereas it repressed *ler* expression and activated *espA* expression (Fig.
32 3A,B,C). Taken together our data indicate that GadE represses LEE1, LEE4, and LEE5
33 expression, and GadX represses LEE1 but activates LEE4 and LEE5 expression.

1 Since it has been reported in non pathogenic *E. coli* K12 that GadX activates or
2 represses *gadE* expression depending on the growth conditions [26,27], we wonder whether
3 GadE and GadX repressed LEE1 independently from each other or whether GadX is epistatic
4 to GadE as in *E. coli* K12. Unexpectedly, *ler* expression was similar in a $\Delta\text{gadE}\Delta\text{gadX}$ double
5 mutant and in the ΔgadX mutant (Fig. 3A), indicating that *gadX* is epistatic to *gadE* in
6 controlling LEE1 expression. Therefore we investigated whether GadE controls *gadX*
7 expression. Figure 3D shows a 33% decrease in *gadX* mRNA levels in the ΔgadE mutant,
8 indicating that GadE activates *gadX* expression. Therefore, since *gadX* is epistatic to *gadE*,
9 the moderate increase in *ler* expression observed in the ΔgadE mutant compared to the wild-
10 type strain (Fig. 3A) is likely due to the lower level of GadX in this strain and not to a direct
11 effect of GadE on *ler* transcription.

12 If GadE influences *gadX* expression, in return GadX also influences *gadE* expression.
13 Indeed, we observed 3.1-fold more *gadE* mRNA copies in the ΔgadX mutant than in the wild-
14 type strain (Fig. 3E), and *gadE* mRNA levels were dramatically reduced in the complemented
15 ΔgadX mutant (Fig. 3E), indicating that, in the growth conditions used, GadX was a repressor
16 of *gadE* expression. It is well documented that Ler activates LEE4 and LEE5 expression [28].
17 However, in the ΔgadX mutant, *ler* was up-regulated whereas LEE4 and LEE5 were down-
18 regulated. Since *gadE* was over-expressed in the ΔgadX mutant, this observation is consistent
19 with data presented above suggesting that GadE represses LEE4 and LEE5 independently of
20 Ler. This repression was high enough to overcome the activation due to the increase in *ler*
21 expression. LEE4 and LEE5 mRNA levels were similar in the $\Delta\text{gadE}\Delta\text{gadX}$ double mutant
22 and in the ΔgadE mutant, confirming that *gadE* is epistatic to *gadX* in controlling LEE4 and
23 LEE5 expression.

24

25 **NO-dependent regulation**

26 To determine whether GadE and/or GadX mediate NO repression of the LEE genes,
27 we quantified *ler*, *espA*, and *tir* mRNA copy numbers in the wild-type strain and in the ΔgadE
28 and ΔgadX mutants using qRT-PCR in bacterial cells subjected to NOR-4 exposure for 6 h.
29 NO-dependent down-regulation of *ler*, *espA*, and *tir* was still observed in the ΔgadE , ΔgadX
30 and $\Delta\text{gadE}\Delta\text{gadX}$ mutants (Fig. 3A,B,C), indicating that LEE1, LEE4 and LEE5 NO-
31 mediated repression is independent of GadE and GadX. In addition, NO-dependent activation
32 of *gadE* was still observed in the ΔgadX mutant (Fig. 3E). These data suggest that a yet
33 unidentified regulator responding to NO represses expression of the LEE genes and activates

1 *gadE* expression. In contrast, NO-dependent activation of *gadX* transcription was suppressed
2 in the Δ *gadE* mutant (Fig. 3D), indicating that NO activates *gadX* expression through GadE.

3 NsrR is the main transcriptional regulator so far described that regulates gene
4 expression in response to NO [29]. Therefore we investigated whether NsrR regulates *gadE*,
5 *gadX*, and LEE gene expression by analyzing mRNA levels in a Δ *nsrR* mutant. In the absence
6 of NO, *ler*, *espA*, and *tir* mRNA levels were 2.6, 7.1, and 14.3-fold lower, respectively, in the
7 Δ *nsrR* mutant than in the wild-type strain, whereas *gadE* and *gadX* mRNA levels were 1.9
8 and 1.5-fold higher, respectively (Fig. 4). These data indicate that NsrR activates LEE1, LEE4
9 and LEE5 gene expression and represses *gadE* and *gadX* expression. Moreover, NO-
10 dependent regulation was abrogated in the Δ *nsrR* mutant (Fig. 4). This is in agreement with
11 the current understanding of the NsrR mechanism of action. Indeed, binding of NO to the
12 NsrR protein causes the release of NsrR from its target promoter and therefore prevents NsrR-
13 dependent regulatory activity [29]. Generally NsrR has a repressive activity on the target
14 genes [29], as we demonstrated for *gadE* and *gadX* in this study. Our data suggest that NsrR
15 may also act as an activator of gene expression for the LEE1, LEE4, and LEE5 genes. To
16 ensure that the changes in mRNA levels resulted from disruption of the *nsrR* gene, we cloned
17 *nsrR* in a low copy number plasmid vector under the control of the *araC* promoter, and
18 introduced the resulting plasmid into the Δ *nsrR* mutant. Wild type levels of *ler*, *espA*, *tir*,
19 *gadE*, and *gadX* mRNAs were restored, although under NO exposure up-regulation of *gadE*
20 and *gadX* was not reestablished (Fig. 4). Taken together our data indicate that NsrR is the main
21 regulator involved in NO-dependent regulation of *gadE* and LEE genes, while up-regulation
22 of *gadX* by NO is mediated by GadE.

24 ***In vivo* binding of GadE, GadX, and NsrR to the target promoters**

25 To investigate whether GadE, GadX and/or NsrR directly bind to the *gadE*, *gadX*, and
26 LEE promoters, and whether these interactions could be affected by NO, we expressed GadE,
27 GadX, and NsrR as 6-His-GadE, 6-His-GadX, and 6-His-NsrR fusions for chromatin
28 immunoprecipitation (ChIP) *in vivo* experiments. The Δ *gadE*, Δ *gadX*, and Δ *nsrR* mutants
29 expressing the 6-His-GadE, the 6-His-GadX, and the 6-His-NsrR fusion protein, respectively,
30 were grown for 6 h in the absence or presence of NOR-4. After cross-linking of DNA-
31 proteins complexes, DNA fragmentation, and immunoprecipitation with anti-6-His antibodies,
32 enrichment of target gene promoters in the immunoprecipitated fraction was investigated by q-
33 PCR amplification.

1 The *gadX* promoter described by Hommais *et al.* [9] (Fig. S1A). and the three
2 promoters described for *gadE* in *E. coli* K12 [30] were amplified (Fig. S1B), as well as the
3 *gadA* promoter as a positive control for GadE and GadX binding. Although Figure 3 shows
4 that cross-regulations occur between GadE and GadX, Figure 5 A,B shows that GadE and
5 GadX did not bind *in vivo* to the *gadX* and *gadE* promoters, respectively, indicating that
6 activation of *gadX* by GadE and repression of *gadE* by GadX occur through indirect
7 regulations.

8 Two *ler* promoters have been described in EHEC, the distal P1 promoter and a
9 putative proximal P2 promoter (Fig. S1C). The P1 promoter is common to EHEC and EPEC,
10 while the P2 promoter is present only in EHEC [31-33]. Neither GadE nor GadX bound to
11 either of these promoters (Fig. 5 A,B). These data indicate that GadE and GadX do not
12 repress *ler* expression directly.

13 The LEE4 promoter has been identified in EHEC upstream of *sepL* [34], *espA* being
14 the second gene of the operon (Fig. S1D). In EPEC it has been shown that Ler-mediated
15 activation of the LEE5 operon requires sequences between positions -198 and -75 relative to
16 the transcriptional start site [4]. Two primer pairs overlapping this region have been designed
17 for ChIP experiments, amplifying a LEE5 distal and a LEE5 proximal region (Fig. S1E).
18 ChIP experiments showed that neither GadE nor GadX bound to the LEE4 and LEE5
19 promoters (Fig. 5 A,B). These data indicate that control of LEE4 and LEE5 expression by
20 GadE and GadX is due to indirect effects and is probably mediated by other regulatory genes
21 of the GadE and GadX regulon.

22 In contrast NsrR bound *in vivo* to the distal LEE1 promoter (P1), and to the LEE4 and
23 LEE5 promoters (Fig. 5 C). In agreement with its known molecular mode of action, NsrR was
24 released from the target DNAs under NO exposure. However, NsrR did not bind to the *gadE*
25 and *gadX* promoters (Fig. 5 C). In agreement with this data, bio-informatics analysis using the
26 MEGA5 software identified sequences presenting high identity with the NsrR consensus
27 binding site [29] in the LEE1, LEE4, and LEE5 promoters (Fig.6and Fig. S1C,D,E), but not in
28 the *gadE* and *gadX* promoters. The NsrR binding site is a 23 bp palindrome sequence
29 composed of two 11 bp half sites. NsrR binds to DNA as a dimer [35]. However, a number of
30 NsrR target promoters contain only a single half site [36]. The *ler* promoter shows the highest
31 identity with both half sites, while the *espA* promoter presents high identity with the first half
32 site and the *tir* promoter with the second half site (Fig. 6).

34 **Adhesion of the regulatory mutants to HeLa cells**

1 In order to confirm the role of NO, NsrR, GadE, and GadX in regulating LEE
2 expression, we investigated the attachment of the regulatory mutants to HeLa cells after 6 h of
3 infection in the presence or absence of NOR-4 (Fig. 7). As expected, EDL933 adhered to
4 HeLa cells and this adhesion was dramatically reduced under NO exposure. The attachment
5 phenotypes of the $\Delta gadE$ and $\Delta nsrR$ mutants correlated with the expression levels of *espA*,
6 *espB*, and *tir* genes since attachment of the $\Delta gadE$ mutant was higher and adhesion of the
7 $\Delta nsrR$ mutant was lower than attachment of the parent strain. Attachment of the $\Delta gadX$
8 mutant was higher than that of the parent strain, in spite of lower levels of *espA* and *tir*
9 expression (Fig. 3B,C). These data suggest that indirect GadX-dependent post-transcriptional
10 or post-translational mechanisms regulate protein synthesis or secretion through the T3SS. A
11 variety of extra-transcriptional mechanisms regulating LEE expression have already been
12 described, though little detailed mechanistic information is available [8]. Complementation of
13 the mutants restored the adhesion phenotype, confirming the functionality of the recombinant
14 regulatory proteins. Adhesion of the $\Delta gadE$ and $\Delta gadX$ mutants was strongly reduced under
15 NO exposure, confirming the GadE- and GadX-independent repressive role of NO. The
16 adhesion level of these strains in the presence of NO was similar to the adhesion level in the
17 absence of NO of the $\Delta escN$ mutant impaired in type 3 secretion. As expected, adhesion of the
18 $\Delta nsrR$ mutant was not influenced by NO, confirming the preponderant role of NsrR in NO-
19 dependent repression of the LEE genes (Fig. 7).

20

21 Discussion

22 In this report we show that NO, a critical mediator of the host mucosal innate immune
23 response, is a potent inhibitor of LEE expression in EHEC and consequently inhibits EHEC
24 adhesion to intestinal epithelial cells. Our finding has a direct biological relevance because we
25 show that not only chemical source of NO, but also activated human epithelial cells-derived
26 NO, inhibits EHEC adhesion. We identified NsrR as a new regulator that controls the
27 expression of LEE genes in EHEC O157:H7 in response to NO, and we propose a regulatory
28 model presenting the role of NsrR, GadE and GadX in LEE expression (Fig. 8). Taken
29 together, consistent qRT-PCR, ChIP experiments, and adhesion assays point out NsrR as the
30 main regulator controlling NO-dependent LEE repression. In the absence of NO (Fig. 8 A),
31 NsrR directly activates LEE1, LEE4, and LEE5 expression, and indirectly represses *gadE* and
32 therefore *gadX* expression; GadE indirectly activates *gadX* expression and represses LEE4
33 and LEE5 expression independently of Ler; GadX indirectly represses *gadE* and LEE1

1 expression. Under NO exposure (Fig. 8 B), NsrR binds to NO and is released from its target
2 DNA, leading to *gadE* and *gadX* up-regulation and to LEE1, LEE4 and LEE5 down-
3 regulation. NO-dependent *gadE* activation results from suppression of NsrR repression. NO-
4 dependent *gadX* activation results from suppression of NsrR-mediated *gadE* repression. NO-
5 dependent LEE1 down-regulation is due to absence of NsrR-mediated activation and to *gadX*
6 up-regulation. NO-dependent LEE4 and LEE5 down-regulation is due to absence of NsrR-
7 mediated activation, to down-regulation of *ler* and up-regulation of *gadE*. This model
8 assumes that repression of *gadX* expression by NsrR is mediated by GadE; this is consistent
9 with the observation that NO-dependent activation of *gadX* is abrogated in the Δ *gadE* and
10 Δ *nsrR* mutants (Fig. 3D). It proposes that GadE represses LEE4 and LEE5 expression
11 independently of Ler, but also via Ler through *gadX* activation. This is consistent with qRT-
12 PCR data shown on Figure 3. Indeed, in the absence of NO, high *espA* and *tir* mRNA levels
13 in the Δ *gadE* mutant resulted both from absence of GadE-mediated repression of LEE4 and
14 LEE5 promoters and up-regulation of *ler* due to low GadX level; down-regulation of LEE4
15 and LEE5 genes in the Δ *gadX* mutant results from the combination of moderate activation by
16 Ler and high repression by GadE. Under NO exposure, NsrR is inactive, and then derepressed
17 *gadE* level leads to LEE4 and LEE5 down-regulation, both in a Ler-independent way, and *via*
18 down-regulation of *ler* due to *gadX* up-regulation.

19 NsrR is a key negative regulator of the nitrosative stress in enterobacteria [20,37].
20 NsrR DNA-binding activity is suppressed by NO, yielding to the expression of various genes
21 involved in NO detoxification. In non-pathogenic *E. coli* K12 strains, NsrR also regulates
22 expression of genes involved in metabolism, motility, protein degradation, surface
23 attachment, stress response and transmembrane transport [36,38,39]. Here we show that NsrR
24 also controls the expression of virulence genes in EHEC as a positive regulator of the LEE
25 that directly activates LEE1, LEE4, and LEE5 operons by binding to their own promoters *in*
26 *vivo*. Until now, direct NsrR effect has always been reported to negatively regulate gene
27 expression. However, in a microarray analysis using an *E. coli* K12 strain harboring a
28 multicopy plasmid that titrates out NsrR, Filenko *et al.* identified 22 transcripts that could be
29 considered to be directly or indirectly activated by NsrR [38]. In addition, NsrR is a member
30 of the Rrf2 family of transcription factors (PF02082, PFam database) that are widespread in
31 bacteria (for a review see [29]). The *E. coli* iron-sulfur cluster regulator IscR is a member of
32 this family. Similarly to NsrR, IscR contains a [2Fe-2S] cluster. IscR represses transcription
33 of the *iscRSUA* operon required for iron-sulfur cluster biosynthesis [40]. However, IscR can

1 also activate gene expression [41,42]. To our knowledge, we report here the first example of
2 direct activation of bacterial gene expression by NsrR. Potential NsrR binding sites were
3 identified in the LEE1, LEE4, and LEE5 promoters. Sequence of the potential NsrR binding
4 site in the LEE1 promoter is overall 86.9% identical to the consensus sequence. In contrast,
5 sequences of the potential NsrR binding sites in the LEE4 and LEE5 operons present a high
6 percentage of identity with only one half site. It has been suggested that, when the NsrR
7 binding site contains only a single half site, one NsrR monomer makes specific contact to the
8 consensus half site and the other monomer forms non specific contact [29]. This could
9 indicate that the affinity of NsrR is stronger for the LEE1 than for the LEE4 and LEE5
10 promoters, but further work is required to confirm the precise NsrR binding sites in the LEE
11 and the NsrR affinity for each site.

12 In addition to the LEE genes, we show that NsrR regulates *gadE* and *gadX* expression.
13 We provide evidences that NsrR represses *gadE* and *gadX* expression, leading to *gadE* and
14 *gadX* upregulation under NO exposure. However, NsrR-dependent repression of *gadX* is
15 mediated by GadE since NO-dependent up-regulation of *gadX* is abrogated in the Δ *gadE*
16 mutant. We did not find a sequence matching the NsrR consensus binding site in the *gadE*
17 promoter, and ChIP experiments failed to demonstrate physical interaction between NsrR and
18 the *gadE* promoter. Therefore, the effect of NsrR on *gadE* transcription is most probably
19 indirect, mediated by an unknown regulator controlled by NsrR. Previous work by Abe *et al.*
20 indicates that Ler down-regulates *gadE* expression and binds to the *gadE* promoter [43]. Since
21 we provide evidence that NsrR activates LEE1 expression, it could be possible that NsrR
22 indirectly represses *gadE* expression through *ler* activation. However, *gadE* expression is still
23 activated by NO in a Δ *ler* mutant (our unpublished results), suggesting that another
24 intermediate than Ler mediates NsrR-dependent repression of *gadE* expression. In summary,
25 NO represses LEE expression directly by preventing NsrR binding to LEE1, LEE4 and LEE5
26 promoters, and indirectly by relieving the repression exerted on *gadE* expression.

27 Influence of GadX has never been investigated in EHEC, while the role of GadE is not
28 clear. While Tatsuno *et al.* described in a Δ *gadE* mutant an increased expression of LEE2,
29 LEE4, and LEE5 that is not correlated to an increased expression of *ler* [24], KailasanVanaja
30 *et al.* showed that the increase expression of LEE genes in the absence of GadE was still Ler-
31 dependent. [12]. These discrepancies are proposed to be due to differences in growth medium
32 and/or differences in the sensitivity of the assays used in each study. Our data reconcile these
33 previous studies showing that GadE may repress LEE4 and LEE5 expression *via* two

1 regulatory cascades, one which is mediated by Ler and one which is Ler-independent (Figure
2 8). Indeed, qRT-PCR experiments indicate that in our culture conditions GadE negatively
3 regulates LEE4 and LEE5 independently of Ler. This is consistent with the work by Tatsuno
4 and co-workers who showed that levels of *espA* mRNA increased in a Δ *gadE* mutant
5 compared to the wild-type strain, while levels of *ler* mRNA were similar in both strains[24].
6 Using ChIP experiments, we did not find physical interaction between GadE and the LEE4
7 and LEE5 promoters. This suggests that GadE-dependent repression of LEE4 and LEE5 is
8 mediated by another regulator. It has been shown that YhiF, encoded like GadE by the acid
9 fitness island [9], represses LEE gene expression independently of Ler [24]. Therefore YhiF
10 is a possible candidate that could regulate LEE4 and LEE5 in response to GadE.

11 It has been shown that GadE can bind to the *ler* promoter *in vitro*[13], while we did
12 not observe such an interaction *in vivo*. Regulation of LEE1 expression is very complex and
13 involves numerous interacting regulatory proteins, the nature and the effect of them
14 depending on the growth conditions [7,44]. Therefore *in vitro* experiments do not reflect
15 physiological conditions, because unknown agonist or antagonist regulators are not
16 necessarily present. It is possible that a regulator that binds to the LEE1 promoter with high
17 affinity competes with GadE binding in our culture conditions. We showed that in these
18 conditions GadE positively regulates *gadX* expression, and we described for the first time that
19 GadX negatively regulates *ler* transcription in EHEC, so that GadE indirectly represses LEE4
20 and LEE5 via GadX and Ler. This is consistent with the work by Kailasan Vanaja and co-
21 workers who observed that GadE represses LEE expression by downregulating *ler*
22 transcription[12]. However, the effect of GadX on LEE1 expression is indirect as no physical
23 interaction between GadX and the LEE1 promoter has been demonstrated *in vivo*. In
24 enteropathogenic *E. coli*, LEE1 expression is activated by the *per* locus, which consists of
25 three genes encoding PerA, PerB, and PerC [45-48]. It has been shown that GadX interacts
26 directly with the *perA* promoter *in vitro* and activates its expression, leading to *ler* activation
27 [25]. In EHEC *perC* homologues have been identified, named *pch* or *perC1* [31,49]. The
28 encoded regulators bind to the LEE1 promoter and activate LEE expression [31,43,49].
29 Pch/PerC1 regulators could be possible intermediates mediating GadX-dependent regulation
30 of LEE1 in EHEC, although interaction of GadX with the *pch/perC1* promoter has not been
31 investigated in EHEC.

32 Repression of the LEE genes under NO exposure is reflected by a poor adhesion of
33 EHEC to human intestinal epithelial cells. We have previously shown that NO inhibits Shiga
34 toxin synthesis and *stx2*-phage release [22]. This study provides more insight into the host

1 fighting against EHEC and HUS development since we establish that the host innate immune
2 response also inhibits EHEC adhesion to intestinal cells. Thus, increasing NO production in
3 infected patients, by using NO donors or L-arginine treatment [50], might represent an
4 alternative strategy to limit the development of HUS by limiting the two key virulence factors
5 of EHEC, adhesion and Stx2 synthesis.

6 7 **Materials and Methods**

8 9 **Bacterial strains and plasmids**

10 Strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. The EHEC O157:H7
11 strain EDL933 [51] was used throughout the study. The $\Delta gadE$ and $\Delta gadX$ single mutants and
12 the $\Delta gadE\Delta gadX$ double mutant generated from the parent strain EDL933 were constructed
13 using the one-step PCR-based method [52,53]. Mutants were verified by PCR to assess the
14 loss of the gene and by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to confirm lack of expression
15 of the gene of interest. The $\Delta nsrR$ mutant strain has been previously described [22]. For
16 complementation analysis and ChIP experiments, the $\Delta gadE$, $\Delta gadX$, and $\Delta nsrR$ genes were
17 amplified with a high fidelity polymerase (Pfx50, Invitrogen) and cloned under the control of
18 the *araC* promoter into a low-copy plasmid containing a 6-histidine tag, pBADHisA,
19 pBADMycHisA (Invitrogen), or in pBAD33 (Table S1). Primer pairs and plasmids used are
20 detailed in supplementary Table S1. Sequence of the cloned gene was checked by nucleotide
21 sequencing, and its expression using qRT-PCR. In addition, to verify the mutation of the
22 *gadE* and *gadX* genes, we analysed the acid resistance of the mutant strains as described [54].
23 As expected acid-resistance of the $\Delta gadE$ and $\Delta gadX$ mutants dropped to 0 and 1.41% of the
24 parent strain, respectively (data not shown). In spite of the 6-His tail and although 6-His-
25 GadE and 6-His-GadX-encoding genes were slightly overexpressed from the recombinant
26 plasmids in comparison to the wild-type genes, the fusion proteins retained their normal
27 physiological activities since *in-trans* complementation restored acid-resistance of the $\Delta gadE$
28 and $\Delta gadX$ mutants. The 6-His-NsrR-encoding gene was expressed at the same level than the
29 wild-type gene.

30 31 **Quantitative real-time PCR**

32 A single colony of EDL933 or isogenic mutants was grown overnight in DMEM Low
33 glucose (#31885, Gibco) containing 10 mM HEPES. The precultures were diluted in fresh

1 medium containing or not 500 μM of the NO donor NOR-4 (Enzo Life Science) to an $\text{OD}_{600} =$
2 0.03 and grown for 6 h at 37°C to an $\text{OD}_{600}=1.2$. The number of viable cells at the end of the
3 incubation was determined by enumeration on solid LB medium after serial 10-fold dilution
4 in phosphate-buffered saline and reached 9.7×10^8 to 1.7×10^9 cfu/ml. The medium was
5 supplemented with ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), kanamycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), chloramphenicol ($25 \mu\text{g}$
6 ml^{-1}), L-arabinose (0.1 mM or 0.5 mM) when appropriate. Total RNA was extracted using the
7 TRI Reagent $\text{\textcircled{R}}$ RNA Isolation Reagent (Sigma). RNA concentration was determined by
8 measuring the A_{260} in a 96-well plate reader (Biotek μ Quant) after 50-fold dilution in RNase-
9 free water. One microgram of each RNA sample was reverse transcribed with Superscript II
10 enzyme (Invitrogen) and 1 μl of random primers (Invitrogen) in a final volume of 20 μl for 50
11 min at 42°C . Control reactions were performed without reverse transcriptase to confirm that
12 the target detected was RNA.

13 Absolute copy numbers of mRNA of the genes of interest were quantified using
14 quantitative real-time PCR (qRT-PCR) as previously described [55] with slight modifications.
15 In brief, standard curves were generated for each gene of interest by amplifying genomic
16 DNA from EDL933 strain with gene-specific primers using Eppendorf Mastercycler $\text{\textcircled{R}}$
17 *eprealplex* (Eppendorf). A standard curve was also generated for the housekeeping gene *rpoA*.
18 Then cDNAs were amplified in the Eppendorf Mastercycler $\text{\textcircled{R}}$ *eprealplex* (Eppendorf)
19 apparatus in the same conditions as for the standard curves. Levels of gene-specific mRNA
20 were quantified by noting the fluorescence crossing point of the samples on the corresponding
21 standard curve. The results are presented as the ratios between the copy number of mRNA of
22 the gene of interest and the copy number of *rpoA* mRNA, and expressed when indicated as a
23 percentage relative to the value obtained for the wild-type strain EDL933 or a mutant strain
24 without NO exposure. Experiments were repeated three to seven times independently. Primers
25 used are listed in Table S1.

26

27 **Cell cultures and infections**

28 The epithelial cell lines Hct-8 and HeLa were maintained in DMEM-HEPES with
29 10%FCS/100 units/ml penicillin/100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin at 37°C under 5% CO_2 . Hct-8 cells
30 (10^6 cells per well) were plated on six-well plates (Nunc) and cultured for 7-10 days. If stated,
31 cells were stimulated for 24 h with a cytokine mix (each obtained from Pierce, Rockford, IL),
32 consisting of human IFN- γ (50 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml), and IL-1 β (5 ng/ml)to induce iNOs
33 synthesis and consequently NO production. HeLa cells were seeded into 24-well plates (10^5

1 cells/well) and grown for 24 h. Subsequently cells were washed, and 1 ml of fresh complete
2 medium devoid of antibiotics was added to the wells. Cells were infected with 10^7 bacteria
3 per well, with and without 200 μ M or 500 μ M NOR-4 for 6 h. After 4 washes with cold PBS,
4 cells were fixed using 1 ml methanol for 15 min at -20°C and stained with 10% Giemsa
5 solution (Sigma) for 20 min. The number of adherent bacteria per cell was determined using
6 the AxioVision 4 software. The TTSS is non functional in the ΔescN strain [6] that is used as a
7 negative control.

8

9 **Chromatin immunoprecipitation**

10 The primers used to amplify target DNA are listed in Table S1 and Fig S1. The
11 recombinant plasmids encoding 6His-GadE, 6His-GadX and 6His-NsrR were electroporated
12 into the respective mutants to avoid native protein interference. Overnight cultures of each
13 strain in LB medium were diluted 1/100 in 25 ml of fresh DMEM medium buffered with
14 Hepes (10 mM), with or without 500 μ M NOR-4. Protein expression was induced with 0.5
15 mM-L-arabinose. After 6 hours of growth with shaking, chromatin immunoprecipitation was
16 performed as described by Lannois *et al.* [56] with slight modifications: protein-DNA
17 complexes were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 30 min. Then
18 cells were pelleted by centrifugation (4500 x g, 7 min, 4°C) and washed twice with cold PBS.
19 Pellet were resuspended in 0.7 ml of lysis buffer (10 mM Tris pH8, 50 mM NaCl, 10 mM
20 EDTA, 20% sucrose) containing lysozyme (10 mg ml^{-1}) (Sigma) and incubated 30 min at
21 37°C . 0.7 ml of 2 x IP buffer (100 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 2% Igepal CA-630, 0.5% Na
22 deoxycholate) containing 1 mM PMSF was added and samples were incubated 15 min at
23 37°C . The samples were cooled down on ice and sonicated for 15 sec at 50% power and
24 incubated on ice for 1 min. Sonication was repeated 11 times. 0.7 ml of each sample was
25 stored at -80°C . 50 μ l of each sample, used for the INPUT DNA, were incubated with 100 μ l
26 of proteinase K solution (36 μ g proteinase K, Sigma, in 100 μ l TE) for 2 hours at 37°C and 8
27 hours at 67°C to reverse crosslinking. The DNA was purified with the kit Qiaquick (Qiagen).
28 Immunoprecipitation was performed by adding anti-Histidine monoclonal antibodies (0.3 μ g,
29 Sigma). The samples were shaken slowly 2 hours at room temperature and then 40 μ l of
30 washed protein G sepharose (Sigma) 50% was added to each sample and incubated 1 hour at
31 room temperature. The beads were washed twice with 1ml of 1 x IP buffer (5 min shaking,
32 then centrifugation 9500 x g, 1 min), twice with 1ml of ChIP wash buffer (10 mM TrisHCl
33 pH8, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% Igepal CA-630, 0.5% Na Deoxycholate) and twice
34 with 1 ml of TE buffer. The beads were resuspended in 100 μ l of elution buffer (50 mM

1 TrisHCl pH8, 10 mM EDTA, 1% SDS), incubated 15 min at 65°C, centrifugated at 9500 x g
2 for 1 min, and the surpernatants containing the immunoprecipitated (IP) DNA were collected
3 to reverse the crosslinking by adding 100 µl of proteinase K solution and incubating for 2
4 hours at 37°C and 8 hours at 65°C. Then samples were purified with the Quiaquick kit
5 (Qiagen) before being amplified by qPCR for analyses with the INPUT DNA in the
6 Eppendorf Mastercycler® *eprealplex* (Eppendorf). Experiments are repeated 2 to 3 times
7 independently.

8 The relative enrichment of DNA targets was calculated as follows for each protein: the
9 promoters of interest as well as a non-specific *rpoA* intragenic region were amplified with
10 specific primers (Table S1). For each DNA target, we calculated the following ratio: DNA
11 copy number in the immunoprecipitated (IP) DNA fraction/ DNA copy number in the INPUT
12 DNA fraction. Then each ratio was divided with the ratio obtained for the non-specific *rpoA*
13 intragenic region in order to eliminate non-specific interaction ((IP/INPUT specific
14 target)/(IP/INPUT *rpoA*)); this was the 6His-protein ratio. Then the same ratio was calculated
15 from the parent strain EDL933 containing the empty pBADMycHisA vector; this was the
16 6His-control ratio. Finally, the relative enrichment of DNA targets was the ratio: 6His-protein
17 ratio/6His-control ratio. For graphic representation this ratio was multiplied 10-fold. In this
18 way the background is eliminated and the values obtained represent only the specific
19 interaction between the 6His-protein of interest and its target promoter. Values higher than 20
20 (twice the control consisting of the parent strain EDL933 containing the empty
21 pBADmycHisA vector) indicate protein binding to the promoter of interest. As positive
22 controls, binding of NsrR to its well-known target *hmpA* [36] gave a value of 40 and binding
23 of GadE and GadX to the *gadA* promoter [9,57] gave respectively values of 36 and 38.

24

25 **Statistics**

26 Statistic tests were performed using the Student *t* test. First, the Student *t* test was
27 performed to compare values from the wild type strain and each mutant or complemented
28 mutant without NOR-4. Then, it was performed to compare values from each mutant or
29 complemented mutant without and with NOR-4.

30

31 **Supporting Information**

32 **Figure S1** Sequence of the DNA fragments used in ChIP experiments. A, sequence of the
33 *gadX* promoter, B, sequence of the *gadE* promoter, C, sequence of the LEE1 promoter, D,
34 sequence of the LEE4 promoter, E, sequence of the LEE5 promoter. Arrows indicate the

1 location of the primers used for ChIP experiments. Boxes indicate the putative NsrR binding
2 sites.

3

4 **Table S1** Strains, plasmids, and oligonucleotides used in the study.

5

6 **Acknowledgements**

7 We thank Annie Garrivier for excellent technical assistance in constructing mutant strains,
8 and Gregory Jubelin for helpful discussion and comments on the manuscript.

9

10 **References**

11

- 12 1. Karmali MA (2004) Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol*
13 *Biotechnol* 26: 117-122.
- 14 2. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte
15 effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U*
16 *S A* 92: 1664-1668.
- 17 3. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, et al. (2000) The locus of enterocyte
18 effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-
19 encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
20 *Infect Immun* 68: 6115-6126.
- 21 4. Haack KR, Robinson CL, Miller KJ, Fowlkes JW, Mellies JL (2003) Interaction of Ler at
22 the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71: 384-392.
- 23 5. Sperandio V, Mellies JL, Delahay RM, Frankel G, Crawford JA, et al. (2000) Activation of
24 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol*
25 *Microbiol* 38: 781-793.
- 26 6. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, et al. (2004) Dissecting virulence:
27 systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S*
28 *A* 101: 3597-3602.
- 29 7. Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL (2009) Controlling injection: regulation
30 of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 17:
31 361-370.
- 32 8. Bhatt S, Romeo T, Kalman D (2011) Honing the message: post-transcriptional and post-
33 translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends Microbiol* 19: 217-
34 224.

- 1 9. Hommais F, Krin E, Coppee JY, Lacroix C, Yeramian E, et al. (2004) GadE (YhiE): a
2 novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*.
3 Microbiol 150: 61-72.
- 4 10. Ma Z, Richard H, Tucker DL, Conway T, Foster JW (2002) Collaborative regulation of
5 *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators,
6 GadX and GadW (YhiW). J Bacteriol 184: 7001-7012.
- 7 11. Tucker DL, Tucker N, Ma Z, Foster JW, Miranda RL, et al. (2003) Genes of the GadX-
8 GadW regulon in *Escherichia coli*. J Bacteriol 185: 3190-3201.
- 9 12. Kailasan Vanaja S, Bergholz TM, Whittam TS (2008) Characterization of the *Escherichia*
10 *coli* O157:H7 Sakai GadE regulon. J Bacteriol 191: 1868-1877.
- 11 13. Tree JJ, Roe AJ, Flockhart A, McAteer SP, Xu X, et al. (2011) Transcriptional regulators
12 of the GAD acid stress island are carried by effector protein-encoding prophages and
13 indirectly control type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
14 Mol Microbiol 80: 1349-1365.
- 15 14. Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, et al. (1998) Profiles of
16 circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic
17 uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. Cytokine 10: 544-548.
- 18 15. Proulx F, Turgeon JP, Litalien C, Mariscalco MM, Robitaille P, et al. (1998)
19 Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and
20 hemolytic-uremic syndrome. Pediatr Infect Dis J 17: 899-904.
- 21 16. Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, et al. (2000)
22 Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic
23 syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues.
24 Cytokine 12: 822-827.
- 25 17. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, et al. (2001) *Helicobacter*
26 *pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for
27 bacterial survival. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 13844-13849.
- 28 18. Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G (2004) Prominent roles of
29 the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive
30 nitrogen species. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 745-750.
- 31 19. Justino MC, Vicente JB, Teixeira M, Saraiva LM (2005) New genes implicated in the
32 protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. J Biol Chem
33 280: 2636-2643.

- 1 20. Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ, Gelfand MS (2005) Dissimilatory
2 metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of
3 transcriptional networks. PLoS Comput Biol 1: e55.
- 4 21. Marion R, Coeffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotte P, et al. (2003) Cytokine-
5 stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human
6 intestinal cells: lack of modulation by glutamine. Clin Nutr 22: 523-528.
- 7 22. Vareille M, de Sablet T, Hindre T, Martin C, Gobert AP (2007) Nitric oxide inhibits
8 Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S
9 A 104: 10199-10204.
- 10 23. Kolios G, Brown Z, Robson RL, Robertson DA, Westwick J (1995) Inducible nitric oxide
11 synthase activity and expression in a human colonic epithelial cell line, HT-29. Br J
12 Pharmacol 116: 2866-2872.
- 13 24. Tatsuno I, Nagano K, Taguchi K, Rong L, Mori H, et al. (2003) Increased adherence to
14 Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic
15 *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 71: 2598-2606.
- 16 25. Shin S, Castanie-Cornet MP, Foster JW, Crawford JA, Brinkley C, et al. (2001) An
17 activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of
18 enteropathogenic virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator,
19 Per. Mol Microbiol 41: 1133-1150.
- 20 26. Sayed AK, Odom C, Foster JW (2007) The *Escherichia coli* AraC-family regulators
21 GadX and GadW activate *gadE*, the central activator of glutamate-dependent acid
22 resistance. Microbiol 153: 2584-2592.
- 23 27. Foster JW (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat Rev
24 Microbiol 2: 898-907.
- 25 28. Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, et al. Enteropathogenic and
26 enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. Mol Microbiol
27 80: 1420-1438.
- 28 29. Tucker NP, Le Brun NE, Dixon R, Hutchings MI (2010) There's NO stopping NsrR, a
29 global regulator of the bacterial NO stress response. Trends Microbiol 18: 149-156.
- 30 30. Sayed AK, Foster JW (2009) A 750 bp sensory integration region directs global control of
31 the *Escherichia coli* GadE acid resistance regulator. Mol Microbiol 71: 1435-1450.
- 32 31. Porter ME, Mitchell P, Free A, Smith DG, Gally DL (2005) The LEE1 promoters from
33 both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by
34 PerC-like proteins from either organism. J Bacteriol 187: 458-472.

- 1 32. Sperandio V, Li CYC, Kaper JB (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: A
2 regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte
3 effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E.coli*. Infect Immun 70: 3085-
4 3093.
- 5 33. Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB (1999) Quorum sensing controls
6 expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in
7 enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A
8 96: 15196-15201.
- 9 34. Lodato PB, Kaper JB (2009) Post-transcriptional processing of the LEE4 operon in
10 enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 71: 273-290.
- 11 35. Tucker NP, Hicks MG, Clarke TA, Crack JC, Chandra G, et al. (2008) The transcriptional
12 repressor protein NsrR senses nitric oxide directly *via* a [2Fe-2S] cluster. PLoS One 3:
13 e3623.
- 14 36. Partridge JD, Bodenmiller DM, Humphrys MS, Spiro S (2009) NsrR targets in the
15 *Escherichia coli* genome: new insights into DNA sequence requirements for binding
16 and a role for NsrR in the regulation of motility. Mol Microbiol 73: 680-694.
- 17 37. Bodenmiller DM, Spiro S (2006) The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a
18 nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. J Bacteriol 188: 874-881.
- 19 38. Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, et al. (2007) The NsrR regulon
20 of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the
21 periplasmic, respiratory nitrite reductase. J Bacteriol 189: 4410-4417.
- 22 39. Thompson KM, Rhodius VA, Gottesman S (2007) SigmaE regulates and is regulated by a
23 small RNA in *Escherichia coli*. J Bacteriol 189: 4243-4256.
- 24 40. Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, Luther C, Ruzicka FJ, et al. (2001) IscR, an Fe-S
25 cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes
26 encoding Fe-S cluster assembly proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 14895-14900.
- 27 41. Giel JL, Rodionov D, Liu M, Blattner FR, Kiley PJ (2006) IscR-dependent gene
28 expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in
29 *Escherichia coli*. Mol Microbiol 60: 1058-1075.
- 30 42. Yeo WS, Lee JH, Lee KC, Roe JH (2006) IscR acts as an activator in response to
31 oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. Mol Microbiol
32 61: 206-218.

- 1 43. Abe H, Miyahara A, Oshima T, Tashiro K, Ogura Y, et al. (2008) Global regulation by
2 horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*.
3 DNA Res 15: 25-38.
- 4 44. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM (2007) Enteropathogenic and enterohemorrhagic
5 *Escherichia coli* virulence gene regulation. Infect Immun 75: 4199-4210.
- 6 45. Gomez-Duarte OG, Kaper JB (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates
7 chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 63:
8 1767-1776.
- 9 46. Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Sonnenberg MS, Kaper JB (1999) The Per regulon of
10 enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel
11 transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator
12 (Ler). Mol Microbiol 33: 296-306.
- 13 47. Porter ME, Mitchell P, Roe AJ, Free A, Smith DG, et al. (2004) Direct and indirect
14 transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from
15 enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 54: 1117-1133.
- 16 48. Tobe T, Schoolnik GK, Sohel I, Bustamante VH, Puente JL (1996) Cloning and
17 characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in
18 enteropathogenic *Escherichia coli* Mol Microbiol 21. 21: 963-975.
- 19 49. Iyoda S, Watanabe H (2004) Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the
20 locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic
21 *Escherichia coli* O157 : H7 to HEP-2 cells. Microbiol 150: 2357-2571.
- 22 50. Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, et al. (2004) Protective role
23 of arginase in a mouse model of colitis. J Immunol 173: 2109-2117.
- 24 51. O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB (1983) *Escherichia coli*
25 O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a
26 *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. Lancet 1: 702.
- 27 52. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, et al. (2004) Global impact
28 of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. Mol Microbiol
29 51: 659-674.
- 30 53. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in
31 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6640-6645.
- 32 54. Large TM, Walk ST, Whittam TS (2005) Variation in acid resistance among shiga toxin-
33 producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 71: 2493-
34 2500.

- 1 55. de Sablet T, Bertin Y, Vareille M, Girardeau JP, Garrivier A, et al. (2008) Differential
2 expression of *stx*₂ variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to
3 seropathotypes A and C. *Microbiol* 254: 176-186.
- 4 56. Lanois A, Jubelin G, Givaudan A (2008) FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads
5 between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic
6 bacterium *Xenorhabdus*. *Mol Microbiol* 68: 516-533.
- 7 57. Tramonti A, Visca P, De Canio M, Falconi M, De Biase D (2002) Functional
8 characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like
9 transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J*
10 *Bacteriol* 184: 2603-2613.

11

12 **Figure legends**

13

14 **Figure 1**

15 Nitric oxide inhibits adhesion of EDL933 to the human intestinal epithelial cell line Hct-8. A,
16 Giemsa coloration. B, number of EDL933 cells adherent per Hct-8 cell numerated on 15
17 microscopic fields. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control without neither NOR-4 nor
18 cytokines (Student *t* test). Cytokines induces iNOS synthesis and thus NO production by the
19 cells.

20

21 **Figure 2**

22 Influence of nitric oxide on LEE, *gadX*, and *gadE* gene expression. A, schematic
23 representation of the LEE showing the structural organization of the main operons and genes.
24 Arrows indicate the orientation of the transcription. The schema is not on scale. B, mRNA
25 copy numbers of LEE, *gadE*, and *gadX* genes. EDL933 was grown for 6 h in the absence
26 (black bars) or presence (grey bars) of 500 μ M NOR-4. Values are the ratios between the
27 absolute mRNA copy number of the gene of interest and of *rpoA* \pm SEM and are the mean of
28 four to six independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared to the strain grown in
29 the absence of NOR-4 (Student *t* test). *ler* (LEE1), *espA* (LEE4), *tir* and *eae* (LEE5) are
30 down-regulated by NO, while *sepZ* (LEE2) is up-regulated and expression of *escV* (LEE3) is
31 unchanged. *gadE* and *gadX* are up-regulated by NO.

32

33 **Figure 3**

1 Influence of nitric oxide, GadE and GadX on gene expression. Expression of *ler* (A),
2 *espA* (B), *tir* (C), *gadX* (D) and *gadE* (E) in the wild-type strain EDL933, the Δ *gadE* and
3 Δ *gadX* isogenic mutants, and the complemented mutants Δ *gadEc* (harboring *pgadE*) and
4 Δ *gadXc* (harboring *pgadX*) grown in the absence (black bars) or presence (grey bars) of NOR-
5 4. Values are the ratios between the absolute mRNA copy number of the gene of interest and
6 of *rpoA* and are given as a percentage of EDL933 normalized to 100%. Values are the mean
7 of three to seven experiments \pm SEM+, $P < 0.05$, ++, $P < 0.01$ for the different EDL933
8 derivatives grown without NOR-4 compared to the parent strain EDL933 grown without
9 NOR-4. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ for comparison of a same strain grown in the absence or in the
10 presence of NOR-4 (Student *t* test). LEE1, LEE4 and LEE5 NO-mediated repression is
11 independent of GadE and GadX. NO-dependent activation of *gadE* is independent of GadX
12 while NO-dependent activation of *gadX* is dependent of GadE.

13

14 **Figure 4**

15 Effect of NsrR on LEE, *gadX*, and *gadE* gene expression. Expression of *ler*, *espA*, *tir*, *gadX*
16 and *gadE* genes in EDL933 (filled bars), the Δ *nsrR* mutant (striped bars), and the in-trans
17 complemented Δ *nsrR* mutant harboring *p33nsrR* (spotted bars) grown in the absence (black
18 bars) or presence (grey bars) of NOR-4. Values are the ratios between the absolute mRNA
19 copy number of the gene of interest and of *rpoA* and are given as a percentage of EDL933
20 normalized to 100%. Values are the mean of three to seven experiments \pm SEM+, $P < 0.05$;
21 ++, $P < 0.01$ for the different EDL933 derivatives grown without NOR-4 compared to the
22 parent strain EDL933 grown without NOR-4. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ for comparison of a
23 same strain grown in the absence or in the presence of NOR-4 (Student *t* test). NsrR activates
24 LEE1, LEE4 and LEE5 gene expression and represses *gadE* and *gadX* expression. NO-
25 dependent repression of LEE1, LEE4, and LEE5 and NO-dependent activation of *gadE* and
26 *gadX* are mediated by NsrR.

27

28 **Figure 5**

29 Chromatin immunoprecipitation. Values represent the relative enrichment in DNA molecules
30 bound to GadE (A), GadX (B), NsrR (C) normalized with the non-specific *rpoA* intragenic
31 DNA and with values obtained in strain EDL933 containing the empty vector as detailed in
32 the Materials and Methods section. Strains were grown in the absence (black bars) or in the
33 presence (grey bars) of NOR-4. Values are the mean of two to three experiments \pm SEM.

1 Values higher than 20 (twice the control consisting of the parent strain EDL933 containing
2 the empty pBADmycHisA vector) indicate protein binding to the promoter of interest. P_{hmpA}
3 is the positive control for NsrR binding and P_{gadA} is the positive control for GadE and GadX
4 binding as *hmpA* and *gadA* are well-known targets of NsrR and GadE/GadX respectively.
5 NsrR binds *in vivo* to the LEE1, LEE4, and LEE5 promoters. This binding is relieved by NO.
6

7 **Figure 6**

8 NsrR binding sites. The putative NsrR binding sites found in the LEE1, LEE4, and LEE5
9 promoters are shown under the NsrR consensus binding site described by Tucker and coll.
10 [29]. Bases matching the consensus sequence are in upper case letters and bases that do not
11 match the consensus sequences are in lower case letters.
12

13 **Figure 7**

14 Adhesion of EDL933 and the regulatory mutants to the human epithelial cell line HeLa. A-L,
15 Giemsa coloration. M, number of cells adherent per Hela cell numerated on 50 cells. $\Delta gadEc$,
16 $\Delta gadXc$, and $\Delta nsrRc$ are the *in-trans* complemented mutants. Magnification 63 x 1.6.
17 Adhesion to HeLa cells is promoted by GadE and GadX and inhibited by NsrR. Under NO
18 exposure, adhesion of each strain is inhibited and similar to that of the $\Delta escN$ strain harboring
19 a non-functional TTSS.
20

21 **Figure 8**

22 Regulatory model. Arrows and lines indicate positive and negative regulation, respectively.
23 Solid lines indicate physical interaction between the regulator and the promoter as
24 demonstrated by ChIP. The thin line indicates a low activation. Dotted lines indicate that no
25 physical interaction has been demonstrated by ChIP between the regulator and the promoter.
26 The differences in police size indicate that *gadE* and *gadX* are up-regulated and LEE1, LEE4,
27 and LEE5 genes down-regulated under NO exposure. A, In the absence of NO, NsrR directly
28 activates LEE1, LEE4, and LEE5 expression and indirectly represses *gadE* and therefore
29 *gadX* expression. GadE activates *gadX* expression and represses LEE4 and LEE5. GadE-
30 dependent LEE4 and LEE5 repression is both Ler-dependent and Ler-independent: GadE
31 represses LEE4 and LEE5 independently of Ler *via* an unidentified intermediate; in addition,
32 GadE activates *gadX*, GadX in turn represses LEE1 expression, leading to repression of LEE4
33 and LEE5 genes. GadX represses *gadE* and LEE1 expression. B, Under NO exposure, NO

1 binds to NsrR which is consequently released from its target DNA. *gadE* and *gadX* are up-
2 regulated while LEE1, LEE4, and LEE5 genes are down-regulated. NO-dependent *gadE*
3 activation results from suppression of NsrR repression. NO-dependent *gadX* activation results
4 from suppression of NsrR-mediated *gadE* repression. NO-dependent LEE1 down-regulation
5 is due to absence of NsrR-mediated activation. NO-dependent LEE4 and LEE5 down-
6 regulation is due to absence of NsrR-mediated activation, to LEE1 down-regulation and to
7 *gadE* up-regulation.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

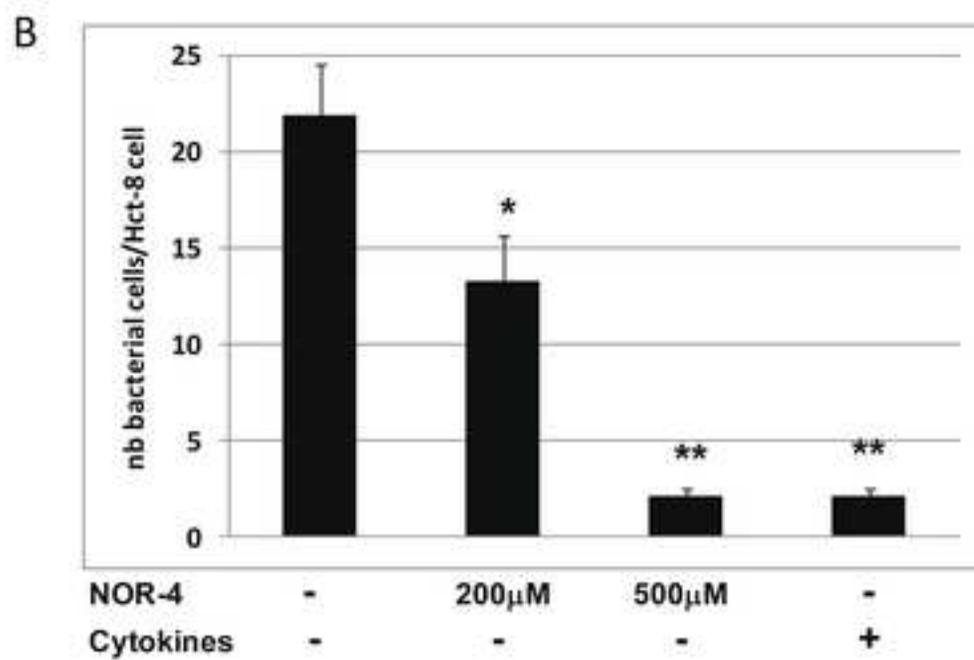
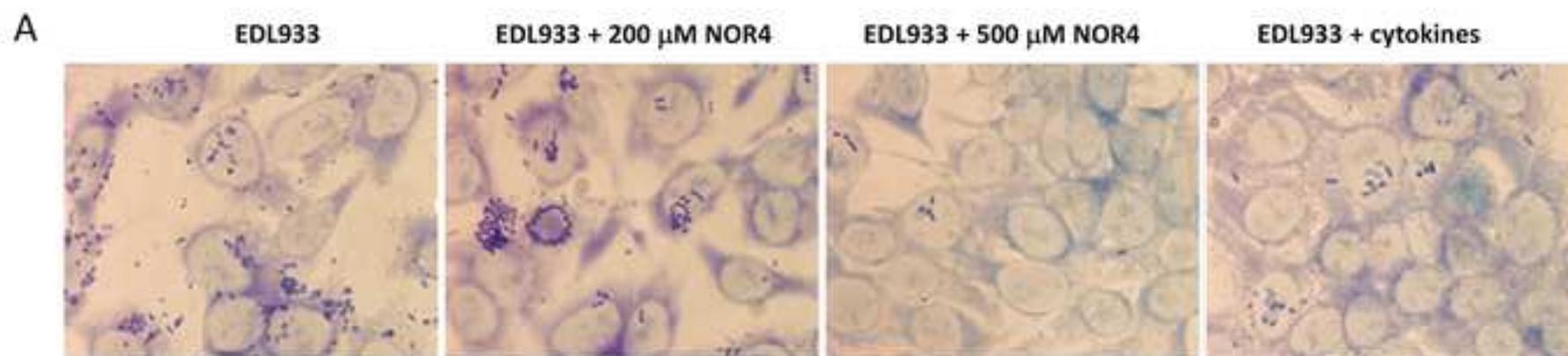


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

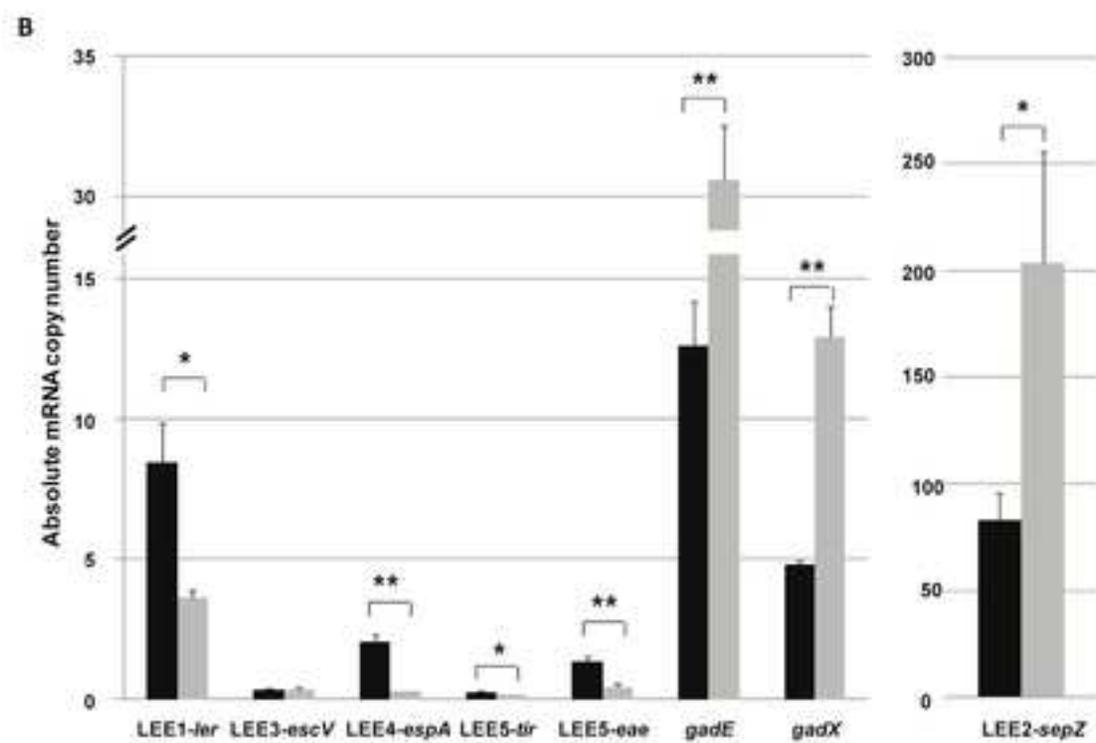
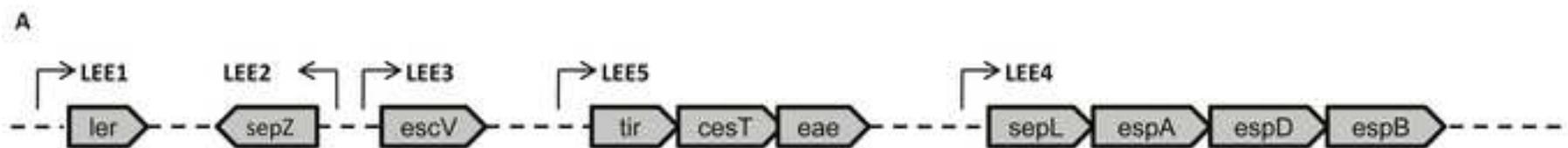


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

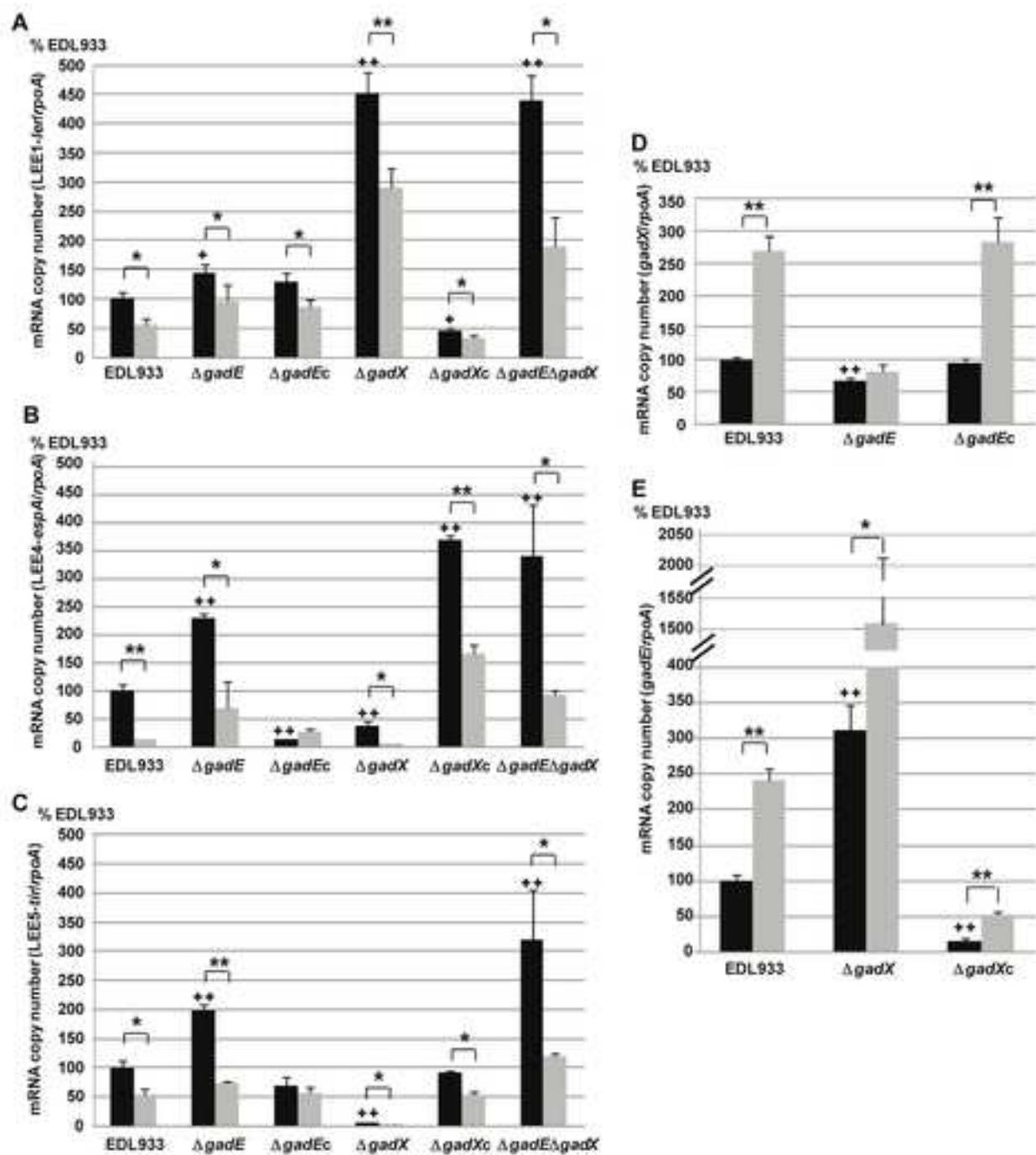


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

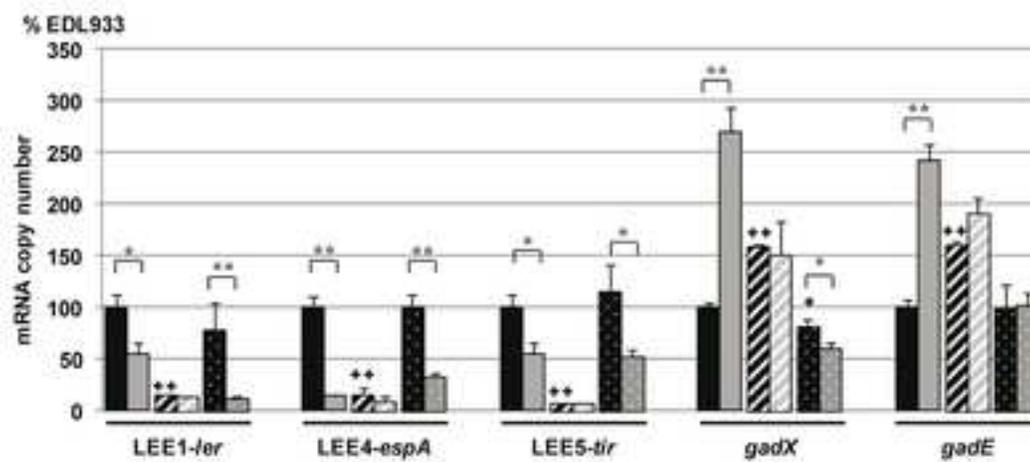


Figure 5

[Click here to download high resolution image](#)

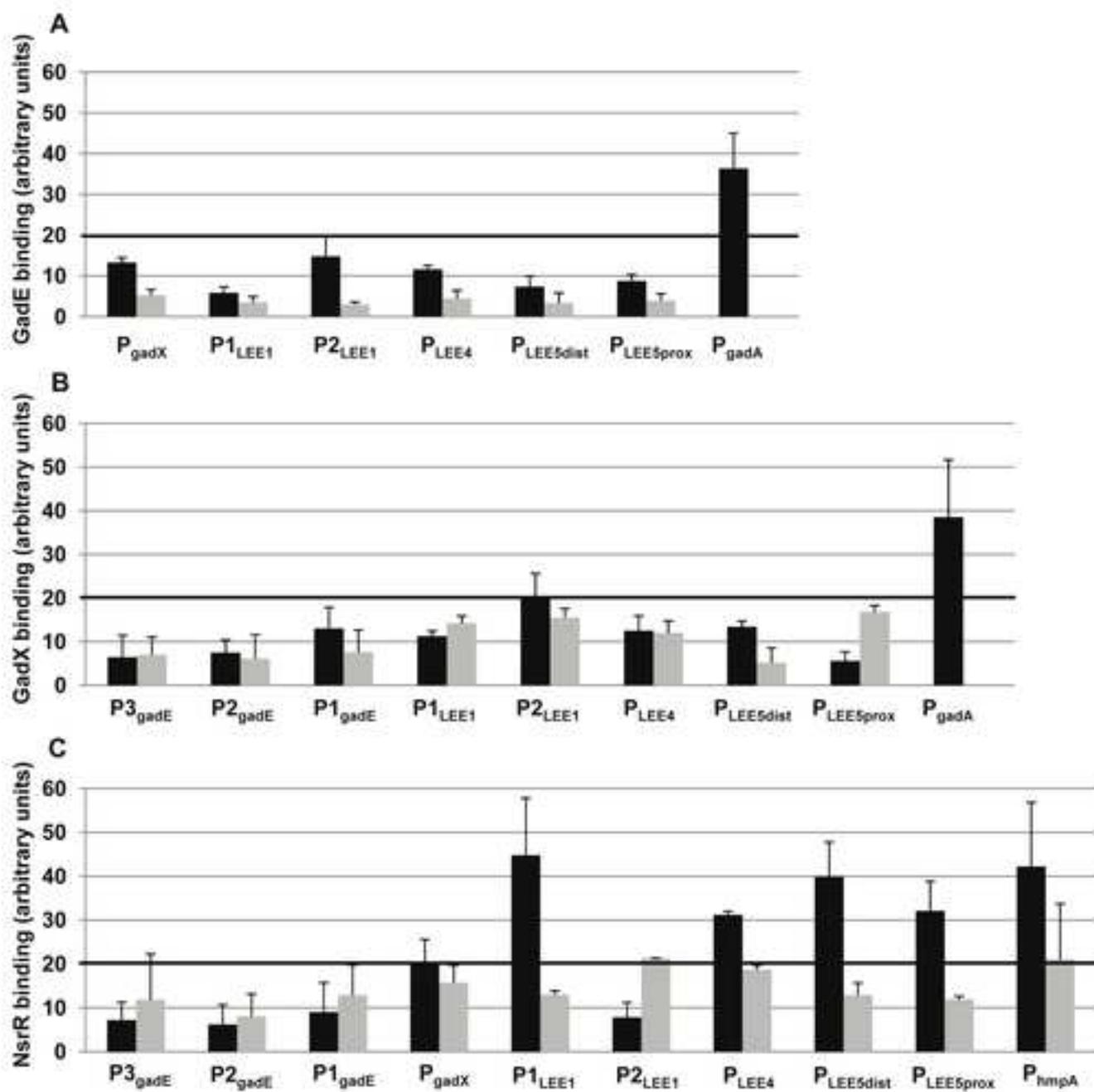


Figure 6

[Click here to download high resolution image](#)

	<u>11 bp half site</u>	<u>11 bp half site</u>
NsrR binding site consensus sequence	AAGATGCATTT A	AAATACAACCTT
	C TT AA T	G GT TTAA
		T G
LEE1 AtCATTgATTT T AAATGgATTTT		
LEE4 AAGtTTTATTT T ATATGaggata		
LEE5 gtttTTTAaTA T AAATGaATGTT		

% identity with the consensus sequence	1st half site	2nd half site	Entire site
<i>ler</i>	81.8	90.9	86.9
<i>espA</i>	90.9	63.6	78.2
<i>tir</i>	54.5	90.9	73.9

Figure 7

[Click here to download high resolution image](#)

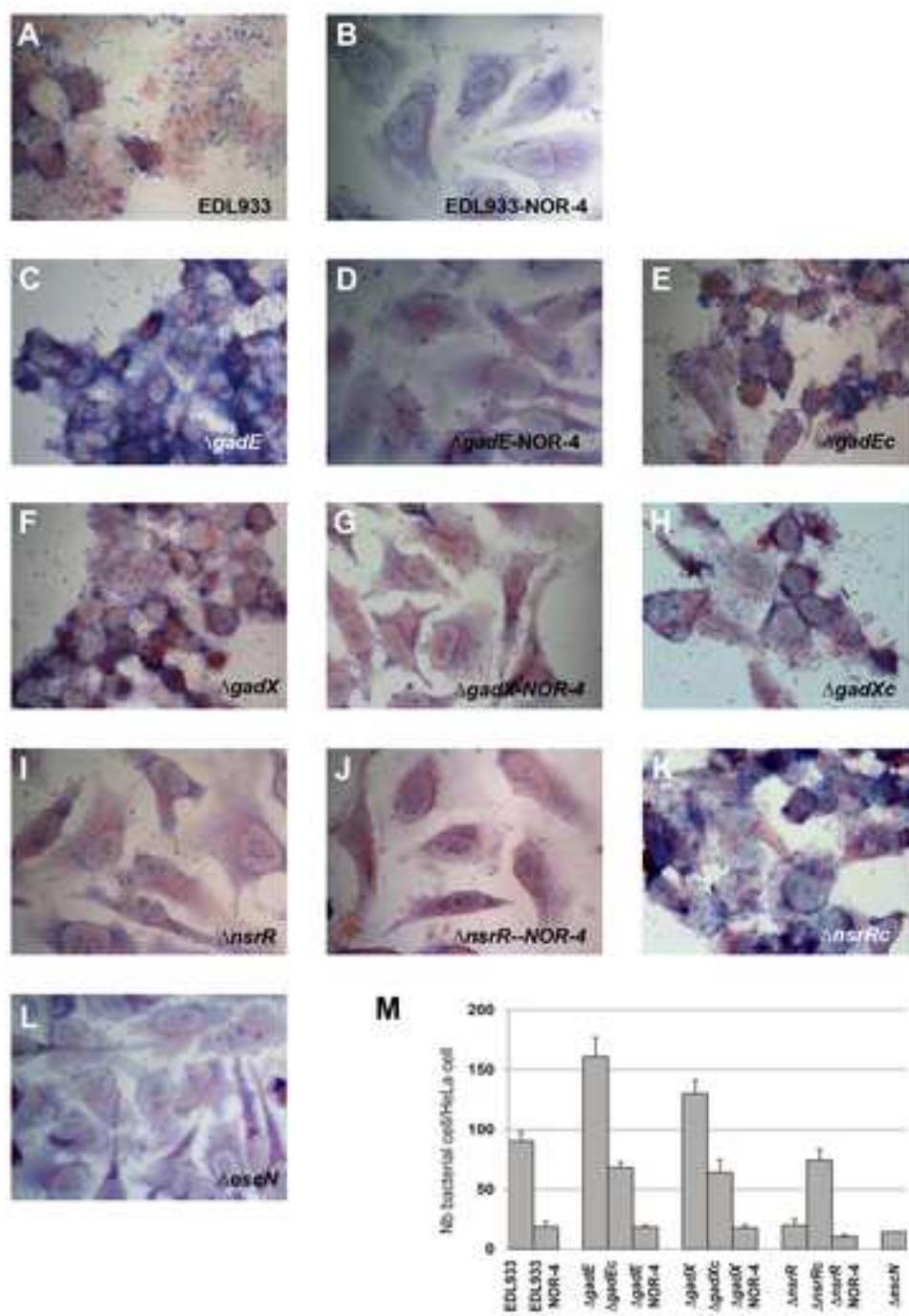
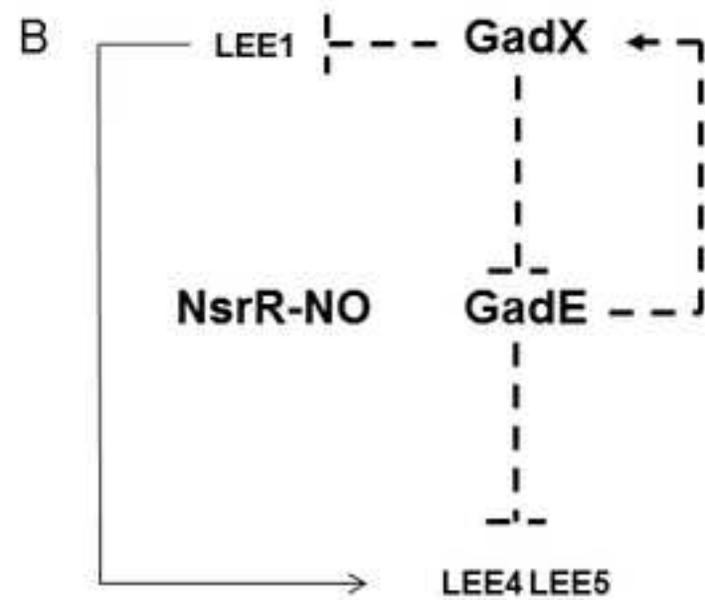
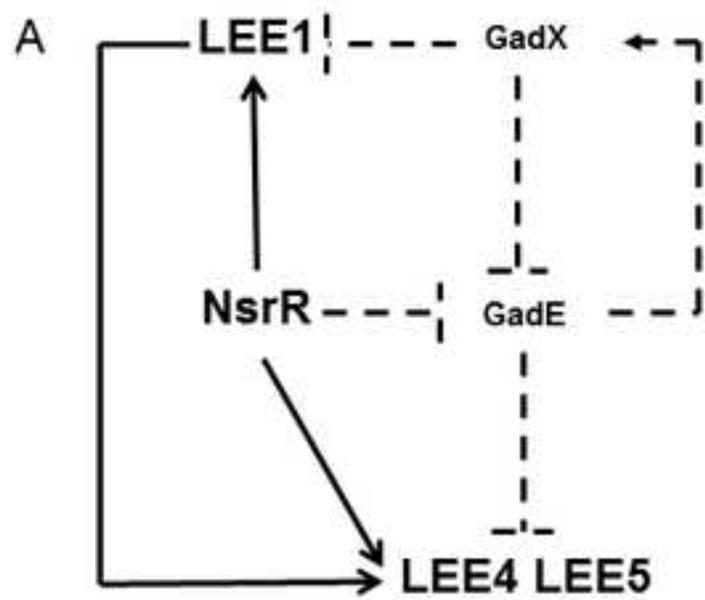


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

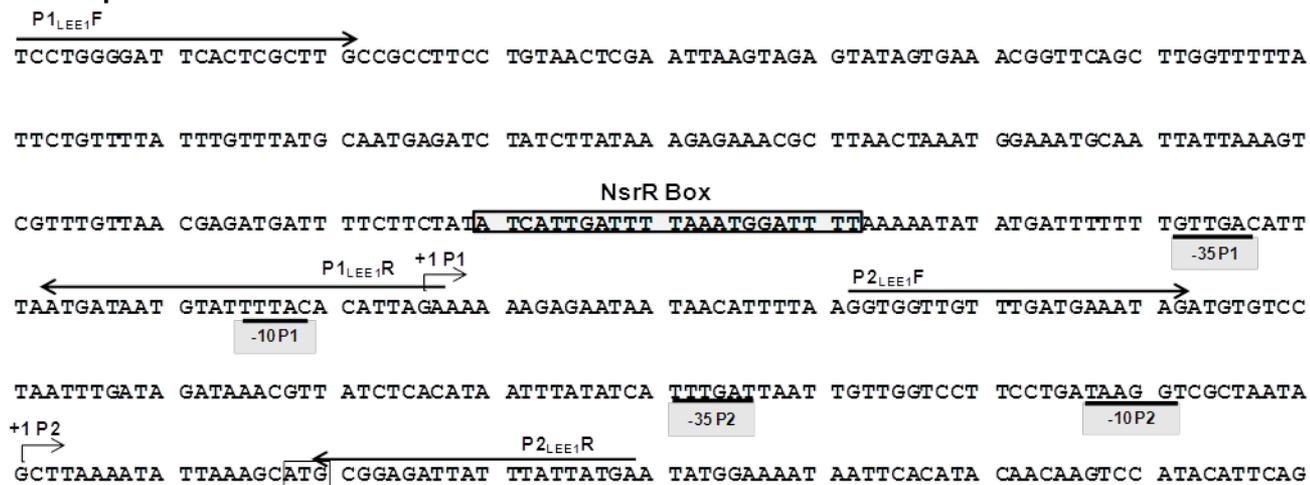
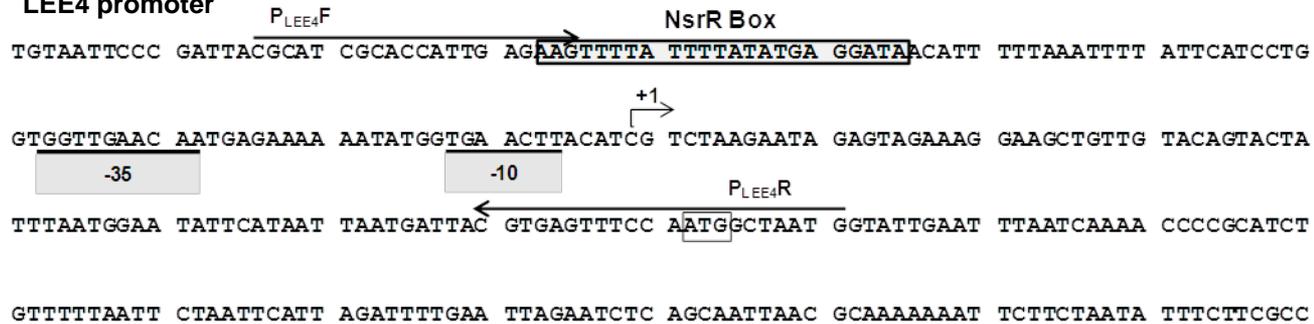
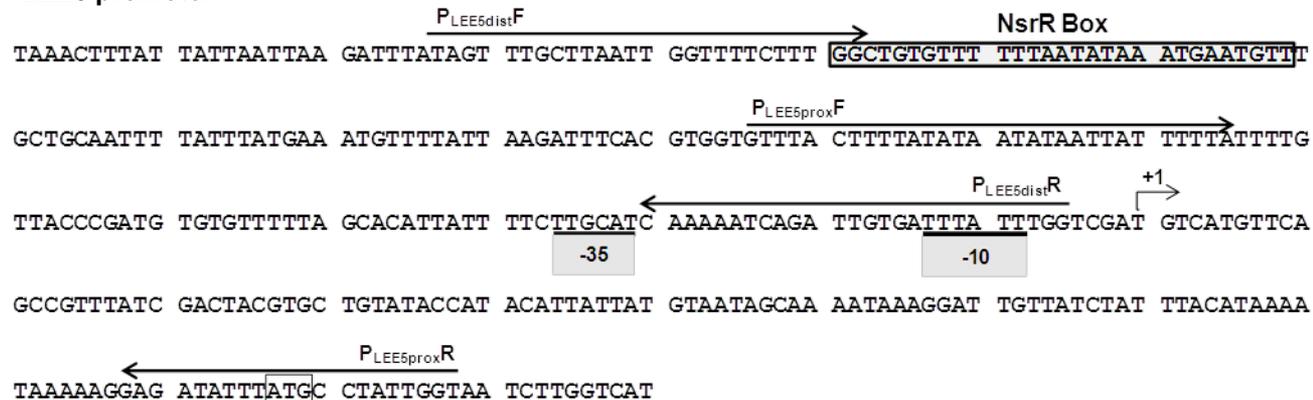


A *gadX* promoter

TACTATTAAT TTCCTGTGT TCTTAAACAC GTTTTTGTAT TATAAATCCA GTCATCCTGC CCGTAGAACA TCACACATTA ^{*gadX_{prom}F*}
^{*gadX_{prom}F*}
 TCATCCTGTT CTCCCGCTTC GTTTAAATTT ATTTATCAAT CAATTTGACT TAAGAGGGCG GCGTGCTACA TTAATAAACA
 GTAATATGTT TATGTAATAT TAAGTCAACT ATGCAATCAC TACATGGGAA TTGTCTAATT GCGTATGCAA GACATAAATA ^{*gadX_{prom}R*}

B *gadE* promoter

AATTATCCCG GTTGTACCC GGATCATAGT CACTTGATGT GACTATGATC CGATTAATAC TCTCTCCGCT ACGCAGTGT ^{*gadE_{P3}F*}
 GTAGATCAAT TGCGCACTAT CATTGAAATA ATTACCTGCT AGTGATTATT TCAACCTACT GAATTCATC TAATTTTTTTT
 CACTCTATGG CAAATTAGCC ATTTCAAACA TTATCATGGC TGATATTTTC CGTAGTCAGG TTTAATGTTT TAAAAGTGCT ^{+1 P3}
 GTGGAAAGT GAACAAAGAG TTCCGTAAGC ^{*gadE_{P2}F*} TGGCGGTTA AATAAGTAAT -10 P3 ^{*gadE_{P3}R*}
^{*gadE_{P3}R*}
 CTGGCGTTGA TTACATTGCA TAAATATCCA TGTCTCCAGA CGCTATATAA AAACCTGAAG ACATGAATGC GTTATTTACT
 CAGGTAATTT CAATGCGTTA AAAGAAAGCT GGCAATCCAA TTGCCAGCTT AAGTCGAAAC AAGGAGACTC GATATTTAAA ^{+1 P2}
 TCGGATTACT TTTTAACTTT AGTAATATTC TTCAGAGATC ACAAACGGT TATTGATAAC ^{*gadE_{P1}F*} -10 P2 ^{*gadE_{P2}R*}
 GCAAACGTTA ACTTTTTGTT TACTATTTAC AAGCTGATAA CAACCAGGAA TCTTACTTAG GATCAATATA TGGAGTGCGT
 GATGGATAAA TCTGAAGTAT TGATTAGTGT TAATAGACGT ATTAGTTCAC GAAGGGCAA GTTCTTATAG GCGTTTACTA ^{+1 P1}
-10 P1 ^{*gadE_{P1}R*}
 TATTGAACAA CGATTCGGAC AAGGATGTAA ATAATGAAAA GGATGACATG TTCGAAACGA TAACGGCTAA GGAGCAAGTT

C**LEE1 promoter****D****LEE4 promoter****E****LEE5 promoter**

Legend Figure S1

A, sequence of the *gadX* promoter, B, sequence of the *gadE* promoter, C, sequence of the LEE1 promoter, D, sequence of the LEE4 promoter, E, sequence of the LEE5 promoter.

Arrows indicate the location of the primers used for CHIP experiments. Boxes indicate the putative NsrR binding sites.

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference
Strains		
EDL933	wild type EHEC O157:H7	(O'Brien <i>et al.</i> , 1983)
$\Delta gadE$	EDL933 $\Delta gadE$ CamR	this work
$\Delta gadX$	EDL933 $\Delta gadX$ CamR	this work
$\Delta gadE\Delta gadX$	EDL933 $\Delta gadE\Delta gadX$ CamR KanR	this work
Δler	EDL933 Δler KanR	this work
$\Delta nsrR$	EDL933 $\Delta nsrR$ KanR	(Vareille <i>et al.</i> , 2007)
$\Delta ler\Delta gadE$	EDL933 $\Delta ler\Delta gadE$ CamR KanR	this work
$\Delta ler\Delta nsrR$	EDL933 $\Delta ler\Delta nsrR$ CamR KanR	this work
Plasmids		
pBAD33	low copy Para CamR	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD24	high copy Para AmpR	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD30	low copy Para AmpR	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBADMycHisA	low copy Para 6His tagged C-ter AmpR	Invitrogen
pBADHisA	low copy Para 6His tagged N-ter AmpR	Invitrogen
<i>pgadE</i>	pBADMycHisA:: <i>gadE</i>	this work
<i>pgadX</i>	pBADHisA:: <i>gadX</i>	this work
<i>pnsrR</i>	pBADMycHisA:: <i>nsrR</i>	this work
<i>pler</i>	pBADHisA:: <i>ler</i>	this work
<i>p33nsrR</i>	pBAD33:: <i>nsrR</i>	this work
<i>p24nsrR</i>	pBAD24:: <i>nsrR</i>	this work
<i>p30nsrR</i>	pBAD30:: <i>nsrR</i>	this work
Oligonucleotides		
Sequence	Use	Reference
ATGATTTTTCTCATGACGAAAGATTCTTTTCTTTTACAG GGCTTTTGGCAgtgtaggctggagctgcttc (F) CTAAAAATAAGATGTGATACCCAGGGTGACGATGTCG CTCATACGTCTTAcatatgaatatcctccttagt (R)	Construction of <i>gadE</i> mutant	this work this work
GCGTGCTACATTAATAAACAGTAATATGTTTATGTAATA TTAAGTCAACTgtgtaggctggagctgcttc (F) TCCTCTTCCCGGTCCCCTATGCCGGGTTTTTTTTATGT CTGAGTAAAACtcatatgaatatcctccttagt (R)	Construction of <i>gadX</i> single mutant	this work this work
GCGTGCTACATTAATAAACAGTAATATGTTTATGTAATA TTAAGTCAACTagccacgttgtgtctcaaaatc (F) TCCTCTTCCCGGTCCCCTATGCCGGGTTTTTTTTATGT CTGAGTAAAACttagaaaaactcatcgagca (R)	Construction of <i>gadX</i> mutant in the <i>gadE</i> mutant	this work this work
CATGCCATGGCCATGTTTCGAAACGATAACG (F) CCCAAGCTTAAAATAAGATGTGATACCCAG (R)	<i>gadE</i> cloning in pBADMycHisA	this work this work
CCGCTCGAGCAATCATTACATGGGAATTG (F) CCCAAGCTTGGAGACGGCAGACTATCCT (R)	<i>gadX</i> cloning in pBADHisA	this work this work
CCGAGCTCGAGACAGTTAACGAGTTTCACTGAT (F) CCCAAGCTTCTCCACCAGCAATAATTTATA (R)	<i>nsrR</i> cloning in pBADMycHisA	this work this work
GACTGCGAGAGCAGGAAGTT (F) GAGTCCATCATCAGGCACATT (R)	<i>ler</i> mRNA quantification	this work this work

GGAACAAATCGCACCGTTAG (F) ATTCTGTGCTGCTCGTCTCC (R)	<i>sepZ</i> mRNA quantification	this work this work
GGGAGCTGATTTGTCTAATAG (F) GCATGACCTCAATTTGCTGTG (R)	<i>escV</i> mRNA quantification	this work this work
CGAAAGAAGCGTTCCAGAAC (F) CTGCTGCTTTAGCCTGCTCT (R)	<i>tir</i> mRNA quantification	this work this work
CGTTCTGTGCAATGGTCAAG (F) CACCGTCGCGGTATAAGTAA (R)	<i>eeae</i> mRNA quantification	this work this work
CGGCACAAAAGATGGCTAAT (F) ACCAGCGCTTAAATCACCCAC (R)	<i>espA</i> mRNA quantification	this work this work
GAGAAATTAGATGCCGAGAG (F) TTGTGAATTCTTATGGGGCA (R)	<i>gadE</i> mRNA quantification	this work this work
CGAGCTGTTGATGAGTCCAA (F) GCAAAGCACGTTGCATTCTA (R)	<i>gadX</i> mRNA quantification	this work this work
GGTGAGAGTTCAGGGCAAAG (F) ACCGCGCTGAACTTTGATAC (R)	<i>rpoA</i> mRNA quantification	this work this work
CCTGGGGATTCACTCGCTTG (F) TCTAATGTGTAATAATACAT (R)	P _{LEE1} promoter quantification	(Kendall <i>et al.</i>) (Kendall <i>et al.</i>)
GGTGGTTGTTGATGAAATAG (F) TCATAATAATAATCTCCGC (R)	P _{2LEE1} promoter quantification	this work (Tree <i>et al.</i>)
GTTTACTTTTATATAATATAATTATTTTT (F) ACCAATAGGCATAAATATCTCC (R)	P _{LEE5prox} promoter quantification	this work this work
ATAGTTTGCTTAATTGGTTTTCTTTG (F) CCAAATAAATCACAATCTGATTTTTG (R)	P _{LEE5dist} promoter quantification	this work this work
CGCATCGCACCATTTGAGAAG (F) CATTAGCCATTGGAAACTCACG (R)	P _{LEE4} promoter quantification	this work this work
CTGGTTATTGATAACTTATTC (F) AACTTGCTCCTTAGCCGTTA (R)	P _{1gadE} promoter quantification	(Tree <i>et al.</i>) (Tree <i>et al.</i>)
TGCTATGGGCGGTTAAATAAG (F) CAAGAATAAGTTATCAATAAC (R)	P _{2gadE} promoter quantification	(Tree <i>et al.</i>) (Tree <i>et al.</i>)
CCGATTAATACTCTCTCCGCTACG (F) CCAGTTGCAAAAAAATGAACCCGG (R)	P _{3gadE} promoter quantification	this work this work
CATCACACATTATCATCCTGTTCTCCCGCT (F) ATGTAGTGATTGCATAGTTG (R)	P _{gadX} promoter quantification	(Hommais <i>et al.</i> , 2004) (Hommais <i>et al.</i> , 2004)
GAACCTCTTAAATTTATTTG (F) TTTGGGCGATTTTTATTACG (R)	P _{gadA} promoter quantification	(Hommais <i>et al.</i> , 2004) (Hommais <i>et al.</i> , 2004)

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxi-infections alimentaires conduisant à des colites hémorragiques pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique. Une fois arrivés dans l'intestin, les EHEC adhèrent aux cellules épithéliales en causant des lésions d'attachement-effacement. Le système de sécrétion de type III et les protéines effectrices requis pour ce phénotype sont codés majoritairement par le *locus* d'effacement des entérocytes (LEE), constitué de plusieurs opérons (LEE1-5). Notre étude a permis de clarifier une des cascades de régulation contrôlant l'expression du LEE. Par des analyses en qRT-PCR et des immunoprécipitations de la chromatine, nous avons déterminé que les régulateurs GadE et GadX sont des répresseurs indirects de l'expression du LEE. GadE active l'expression de *gadX*, et GadX réprime l'expression de *ler*, codant pour le principal activateur des opérons LEE2-5. De plus, GadE réprime aussi l'expression des opérons LEE4 et LEE5 indépendamment de Ler. En retour, Ler réprime l'expression de *gadE* et de *gadX*.

Le monoxyde d'azote (NO) est un effecteur majeur de la réponse immune innée, produit en particulier par les cellules épithéliales intestinales. Il avait été montré que le NO réprime l'expression du LEE et active celle de *gadE* et de *gadX*. Notre étude a permis d'identifier le régulateur clé responsable de ces régulations, NsrR. NsrR réprime indirectement l'expression de *gadE* et *gadX* et active l'expression des opérons LEE1, LEE4 et LEE5 en se fixant sur leurs promoteurs respectifs. En présence de NO, NsrR devient inactif. Ainsi, le NO réprime directement l'expression du LEE en supprimant la fixation de NsrR aux promoteurs du LEE1, LEE4 et LEE5, et indirectement en activant l'expression de *gadE* et donc de *gadX*. Un modèle de régulation intégrant l'ensemble de ces résultats est proposé.

D'autre part, nous avons identifié et caractérisé une nouvelle phosphodiesterase spécifique des EHEC les plus pathogènes, VmpA. Par son activité d'hydrolyse du di-GMPc, VmpA contrôle la mobilité bactérienne, la formation de biofilm, et probablement l'expression du LEE, mais aurait aussi un rôle plus général dans la physiologie des EHEC.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a foodborne pathogen causing hemorrhagic colitis and Hemolytic and Uremic Syndrome (HUS). After reaching the gut, EHEC adhere to the epithelial intestinal cells causing attachment/effacement lesions (A/E lesions). The *locus* of enterocyte effacement (LEE) encodes for a type three secretion system and several effector proteins required for A/E lesions. The LEE is composed of five main operons (LEE1-5). In this work we identified the molecular mechanisms of one of the regulatory cascades controlling LEE expression. Using qRT-PCR and chromatin immunoprecipitation we determined that GadE and GadX are two indirect repressors of LEE expression. GadE activates *gadX* expression, and GadX represses *ler* expression, the latter encoding the main activator of LEE2-5 operons. Moreover, GadE also represses LEE4 and LEE5 expression independently of Ler. In turn, Ler represses *gadE* and *gadX* expression.

Nitric oxide (NO) is a crucial effector of the innate immune response, in part produced by intestinal epithelial cells. It has been shown previously that NO represses LEE and activates *gadE* and *gadX* expression. In this study we identified the key regulator responsible for these regulations: NsrR. NsrR represses indirectly *gadE* and *gadX* expression and activates LEE1, LEE4 and LEE5 expression by binding to their respective promoter. In the presence of NO, NsrR is inactivated. Thus, NO directly represses LEE expression by relieving NsrR binding to the LEE1, LEE4 and LEE5 promoters, and indirectly by activating *gadE* and *gadX* expression. A regulatory model is proposed based on these results.

In addition, we identified and characterized a new phosphodiesterase which is specific for the most virulent EHEC strains: VmpA. By degrading c-di-GMPc, VmpA controls motility, biofilms formation, and probably LEE expression. It would also have a global effect on EHEC physiology.